

**Blut-Hirnschranke-Modelle ECV304-C6 und HBMEC  
und ihre Anwendung in Transmigrationsuntersuchungen von  
Streptokokken und afrikanischen Trypanosomen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Christopher Untucht

aus Simmern im Hunsrück

1. Referent:	Professor Dr. Michael Steinert
2. Referent:	apl. Professor Dr. Manfred Rohde
eingereicht am:	27.07.2011
mündliche Prüfung (Disputation) am:	10.10.2011
Druckjahr	2011

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **Publikationen**

"An optimized *in vitro* blood-brain barrier model reveals bidirectional transmigration of African trypanosome strains" Untucht, C.; Rasch, J.; Fuchs, E.; Rohde, M.; Bergmann, S.; Steinert, M. accepted for publication in *Microbiology* (2011)

"Fast investigations from biological matrices using CE – test of a blood-brain barrier model" Kühne, S.; Untucht, C.; Steinert, M.; Wätzig, H. accepted for publication in *Electrophoresis* (2011)

## **Tagungsbeiträge**

"African Trypanosomes transmigrate across an *in vitro* Blood Brain Barrier model in both directions" (TALK) Untucht, C.; Rasch, J.; Rohde, M.; Bergmann, S.; Steinert, M. DGHM, Essen, 2011

"Drug analysis in the presence of matrix proteins: Validation of a blood-brain barrier model by direct-injection MEKC" (TALK & POSTER) Kühne, S.; Untucht, C.; Steinert, M.; Wätzig, H.; Doktorandentagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Ostseebad Heringsdorf, 2011

"Drug quantification in the presence of matrix proteins: A MEKC method with direct sample injection" (POSTER) Kühne, S.; Untucht, C.; Steinert, M.; Wätzig, H.; HPLC, Budapest 2011

"African trypanosomes transmigrate an optimized blood-brain barrier model bidirectionally" (TALK) Untucht, C.; Rohde, M.; Steinert, M.; 6. Joint Ph.D. Students Meeting of SFBs 630; 766, 544 in Ellwangen, Germany, 2010

"Establishment of an *in vitro* blood-brain barrier model to investigate the blood to brain transmigration of African trypanosomes" (POSTER) Untucht, C.; Rohde, M.; Steinert, M.; 3<sup>rd</sup> Joint Conference of the DGHM (German Society for Hygiene and Microbiology) and VAAM (Association for General and Applied Microbiology), Hannover 2010

"Streptokokken und afrikanische Trypanosomen überwinden ein *in vitro* Blut-Hirnschranke Modell" (POSTER) Untucht, C.; Kühne, S.; Wätzig, H.; Rohde, M.; Steinert, M.; 126. GDNÄ (Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte). Dresden, 2010

"Drug analysis in the presence of matrix proteins: Validation of a blood-brain barrier model by direct-injection micellar electrokinetic chromatography" (POSTER) Kühne, S.; Untucht, C.; Steinert, M.; Wätzig, H.; Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Braunschweig, 2010

"A direct injection MEKC Method for drug analysis in the presence of Matrix proteins" (TALK) Kühne, S.; Untucht, C.; Steinert, M.; Wätzig, H.; Drug Analysis, Antwerpen, 2010

"Development and Characterization of an in-vitro Blood-Brain Barrier model" (POSTER) Untucht, C.; Rohde, M.; Steinert, M.; Summer School on Infection Biology of the "Fachgruppe Mikrobielle Pathogenität" of DGHM/VAAM, Bad Urach, 2008

# DANKSAGUNG

Folgenden Personen möchte ich herzlich danken...

Prof. Dr. Michael Steinert für die Möglichkeit, über ein spannendes Thema zu promovieren, den nahezu unendlichen Optimismus und das Vertrauen in meine Arbeit.

Prof. Dr. Manfred Rohde und Prof. Dr. André Fleißner für die Übernahme des Zweitgutachtens bzw. des Prüfungsvorsitzes.

Den Kooperationspartnern Prof. Dr. H. Wätzig und Sascha Kühne von der TU Braunschweig, Prof. Dr. M. Rohde, Dr. Markus Fulde und Prof. Dr. S. Chhatwal vom HZI in Braunschweig, Prof. Dr. T. Schirmeister und Carolin Schad von der Universität Würzburg und Prof. Dr. Reto Brun vom STI in Basel für die gute Zusammenarbeit.

PD Dr. Simone Bergmann für ihre Energie und Motivationskraft, ihre Hilfsbereitschaft, das Korrekturlesen meiner Arbeit sowie den Spaß im Labor und die Freundschaft.

Frederike Frese und Jana Tiefenau für die erfüllende Freundschaft, die gemeinsame Zeit im Labor und viele lustige Stunden.

Meinen Studentinnen Janine Rasch und Elena Fuchs für ihren Wissensdurst, ihren Arbeitseifer und für die schöne gemeinsame Zeit.

Der gesamten Arbeitsgruppe und insbesondere Gabi, Olga, Corina, Corinna, Jens, Steffi, Dennis & Dennis, Julia, Danni, Siegfried, Barbara, Kathrin, Qunxiu, Marc, Jasper & Emma für die freundschaftliche Zusammenarbeit und den Spaß bei der Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Mikrobiologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Frau Bianca Kowal für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Meiner Mutter für die herzliche und andauernde Unterstützung.

„Jedes Naturgesetz, das sich dem Beobachter offenbart,  
lässt auf ein höheres, noch unerkanntes schließen.“

Alexander von Humboldt (1769-1859)

*in memoriam patri mei*

# INHALTSVERZEICHNIS

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

### DANKSAGUNG

1	Zusammenfassung .....	1
1.1	Summary .....	1
1.2	Zusammenfassung .....	2
2	Einleitung .....	3
2.1	Die Blut-Hirnschranke .....	4
2.1.1	Aufbau und Funktion .....	5
2.1.2	Infektiöse Erkrankungen des ZNS .....	10
2.1.3	Modellsysteme .....	11
2.2	Trypanosomen .....	13
2.2.1	Afrikanische Trypanosomiasis der Tiere .....	14
2.2.2	Chagaskrankheit .....	15
2.2.3	Die Afrikanische Schlafkrankheit .....	18
2.2.4	Biologie und Pathogenität von <i>T. brucei</i> ssp. ....	23
2.3	Streptokokken .....	29
2.3.1	Kommensalen und Krankheitserreger .....	30
2.3.2	<i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	32
2.3.2.1	Epidemiologie, Prävention und Therapie .....	33
2.3.2.2	Kolonisation und Adhärenz .....	35
2.3.2.3	Infektion und Transmigration .....	39
2.4	Zielsetzung und Vorgehensweise .....	43
3	Material und Methoden .....	44
3.1	Geräte .....	44
3.2	Chemikalien und Medien .....	45
3.3	Verbrauchsmaterialien .....	45
3.4	Organismen .....	46
3.5	Kulturmethoden .....	49

3.5.1	Bakterien.....	49
3.5.1.1	<i>Escherichia coli</i> .....	50
3.5.1.2	Streptokokken.....	51
3.5.2	Trypanosomen .....	52
3.5.2.1	Adaptation an andere Medien.....	56
3.5.2.2	Subkultivierung.....	57
3.5.2.3	Kryokonservierung .....	57
3.5.3	Eukaryontische Zelllinien.....	58
3.5.3.1	Subkultivierung.....	59
3.5.3.2	Kryokonservierung .....	60
3.6	Mikroskopie.....	61
3.6.1	Zellzahlbestimmungen.....	61
3.6.1.1	Trypanosomen .....	61
3.6.1.2	Eukaryontische Zelllinien.....	62
3.6.2	Doppelimmunofluoreszenzmikroskopie .....	62
3.6.3	Vorbereiten von REM-Proben .....	64
3.7	Vitalität und Wachstum .....	65
3.7.1	Kontrolle auf Mykoplasmen.....	66
3.7.1.1	Die Polymerasekettenreaktion.....	66
3.7.1.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	68
3.7.2	Wachstumsversuche mit Trypanosomen .....	69
3.7.3	Kokultur von Trypanosomen und Zellen.....	69
3.8	Kapselmutagenese bei Pneumokokken.....	70
3.8.1	Isolierung genomischer DNA aus Pneumokokken.....	71
3.8.2	Amplifikation der Kanamycinkassette.....	73
3.8.3	Transformation.....	74
3.8.4	Southern Blot.....	75
3.8.4.1	Herstellung der Sonde.....	76

---

3.8.4.2	Restriktionsverdau .....	77
3.8.4.3	Blotverfahren .....	77
3.8.4.4	Hybridisierung und Detektion.....	78
3.9	Blut-Hirnschranke Modellsysteme.....	81
3.9.1	Das ECV304-C6 Modell.....	81
3.9.2	Das Inverse ECV304-C6 BHS-Modell .....	83
3.9.3	Das HBMEC-Modell.....	83
3.9.3.1	Gelatinebeschichtung von Transwelleinsätzen .....	84
3.10	Transmigrationsversuche an BHS-Modellen.....	84
3.10.1	<i>E. coli</i> und Streptokokken .....	84
3.10.1.1	<i>E. coli</i> HB101 und K1 .....	84
3.10.1.2	Streptokokken .....	85
3.10.2	Trypanosomen und Makrophagen.....	86
3.10.2.1	<i>Trypanosoma brucei</i> ssp.....	86
3.10.2.2	J774-Makrophagen und Kotransmigration.....	86
3.10.3	Permeation von Arzneistoffen.....	87
3.10.3.1	Mizellare elektrokinetische Kapillarchromatografie.....	88
3.10.4	Test auf Transmigrationsinhibition.....	89
3.11	Western Blot.....	90
3.11.1	SDS-PAGE.....	91
3.11.2	Blotverfahren und Detektion .....	92
3.12	Versuchsauswertung und Statistik.....	95
4	Ergebnisse .....	96
4.1	BHS-Modelle .....	96
4.1.1	Charakterisierung des ECV304-C6 BHS-Modells .....	96
4.1.1.1	Selektive Permeabilität für <i>E. coli</i> .....	96
4.1.1.2	Rasterelektronenmikroskopie veranschaulicht Zellstruktur.....	98
4.1.1.3	Permeabilität für Arzneistoffe .....	100



4.1.2	Etablierung des HBMEC-Modells.....	103
4.1.2.1	Evaluierung der <i>E. coli</i> HB101 Permeabilität.....	103
4.1.2.2	Immunofluoreszenzmikroskopie invasiver Pneumokokken .....	105
4.1.3	Ausschluss von Mykoplasmen .....	107
4.1.4	Nachweis des Lamininrezeptors.....	108
4.2	Trypanosomen .....	109
4.2.1	Trypanosomales Wachstum in Infektionsmedien.....	109
4.2.2	Transmigration über das ECV304-C6 BHS-Modell.....	111
4.2.2.1	Bidirektionale Transmigration.....	111
4.2.2.2	Rasterelektronenmikroskopie der Trypanosomalen Transmigration.....	113
4.2.3	Kokultur von Makrophagen und Trypanosomen.....	114
4.2.4	Makrophagen verringern trypanosomale Transmigration.....	116
4.2.5	Proteaseinhibitoren verringern trypanosomale Transmigration.....	118
4.3	Streptokokken .....	120
4.3.1	Kapseldeletion in klinischen Isolaten.....	120
4.3.2	Transmigration über die ECV304-C6 BHS.....	124
4.3.2.1	Transmigration von <i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i> .....	124
4.3.2.2	Transmigration von <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	125
4.3.2.3	Transmigration von <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	128
4.3.3	Transmigration von Pneumokokken über die HBMEC-BHS.....	134
5	Diskussion .....	137
5.1	BHS-Modelle.....	137
5.2	Transmigration von Trypanosomen.....	148
5.3	Transmigration von Streptokokken.....	158
5.4	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	165
6	Anhang .....	171
6.1	Abkürzungsverzeichnis .....	171
6.2	Ergänzungen .....	172
6.2.1	Rohdaten Wachstumsversuche mit Trypanosomen .....	172

6.2.2	Protokoll: RTP® DNA/RNA Virus Mini Kit (Invitek).....	173
6.2.3	Protokoll: QIAquick Gel Extraction Kit.....	174
6.3	Abbildungsverzeichnis.....	176
6.4	Tabellenverzeichnis.....	177
6.5	Literaturverzeichnis.....	180

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

## 1.1 SUMMARY

The blood-brain barrier (BBB) is a physiological barrier separating the blood circulation from the central nervous system (CNS) and protects the CNS from most toxins and pathogens. Some streptococcal species are opportunistic pathogens that manage to cross the BBB and cause life threatening meningitis. As well as some eukaryotic parasites like African trypanosomes they multiply within the bloodstream and finally invade the CNS. *Trypanosoma brucei gambiense* and *T. b. rhodesiense* are the causative agents of the fatal human African sleeping sickness. They are transmitted during a bite of an infected tsetse fly.

In this work the BBB models ECV304-C6 and HBMEC were further developed for transmigration studies with streptococci and African trypanosomes. The optimized ECV304-C6 model was characterized by electron microscopy. It was shown to be selective permeable for the neuro-invasive *E. coli* K1 in contrast to the apathogenic *E. coli* HB101. Transmigration analysis with different streptococcal clinical isolates revealed that the transmigration of different capsule serotypes correlates only within few cases with the clinical characterization. The deletion of the capsule locus from a serotype 7F pneumococcal clinical isolate resulted in a capsule mutant showing distinct reduction of transmigration across both BBB models.

Transmigration studies with the human pathogenic parasites *T. b. gambiense* and *T. b. rhodesiense* as well as the animal pathogenic *T. b. brucei* across the optimized ECV304-C6 BBB model revealed an effective and bidirectional transmigration indicating the relevance of the CNS as a possible reservoir of a relapsing parasitemia. The transmigration of macrophages across the ECV304-C6 BBB model did not facilitate the trypanosomal transmigration and demonstrates that the model system is reliable und selective for paracellular processes. Furthermore new brucipaine cysteine protease inhibitors were shown to efficiently reduce the trypanosomal transmigration. At last the optimized ECV304-C6 BBB model was proven as a selective barrier for the translocation of pharmaceutical compounds. It is therefore eminently suitable for the screening of compounds active against CNS invasive pathogens.

The performance of successful transmigration studies with BBB models as shown here is the first step towards the improvement and development of new therapies for neuro-invasive infectious diseases.

## 1.2 ZUSAMMENFASSUNG

Die Blut-Hirnschranke (BHS) ist eine physiologische Barriere zwischen dem Blutkreislauf und dem zentralen Nervensystem (ZNS) und schützt dieses vor Toxinen und Pathogenen. Einige Streptokokkenarten sind als opportunistische Krankheitserreger fähig, die BHS zu durchbrechen und eine lebensbedrohliche Meningitis auszulösen. Auch einige eukaryontische Parasiten wie afrikanische Trypanosomen vermehren sich im Blutstrom und überwinden schließlich die BHS. *Trypanosoma brucei gambiense* und *T. b. rhodesiense* werden von der Tsetsefliege auf den Menschen übertragen und verursachen die tödliche humane afrikanische Schlafkrankheit.

In dieser Arbeit wurden die BHS-Modelle ECV304-C6 und HBMEC für Transmigrationsstudien mit Streptokokken und Trypanosomen weiterentwickelt. Das optimierte ECV304-C6 Modell wurde rastelektronenmikroskopisch charakterisiert und zeichnete sich durch eine selektive Permeabilität für den neuroinvasiven *E. coli* K1 im Vergleich zu dem apathogenen *E. coli* HB101 aus. Bei der Untersuchung der Transmigration verschiedener klinischer Streptokokkenisolate stellte sich sowohl im ECV304-C6 als auch im HBMEC BHS-Modell heraus, dass das Transmigrationsverhalten unterschiedlicher Kapselserotypen nur in einigen Fällen mit der klinischen Charakterisierung korrelierte. Die Kapsellokusdeletion bei einem klinischen Serogruppe 7F Pneumokokkenisolat führte hingegen zu einer Kapselmutante mit einer deutlichen Reduzierung der Transmigration in beiden Modellsystemen.

Die Transmigrationsuntersuchungen der humanpathogenen Parasiten *T. b. gambiense* und *T. b. rhodesiense* und des tierpathogenen *T. b. brucei* im ECV304-C6 BHS-Modell demonstrierten eine effektive und bidirektionale Transmigration und belegen die Bedeutung des ZNS als Reservoir für rezidivierende Krankheitsverläufe. Die Transmigration von Makrophagen über die ECV304-C6 BHS erhöhte die trypanosomale Transmigrationsrate nicht und beweist dass das Modellsystem für parazelluläre Prozesse stabil und selektiv bleibt. Darüber hinaus wurde die trypanosomale Transmigration durch neue Brucipain-Cysteinprotease-Inhibitoren effektiv verringert. Schließlich zeigte sich das ECV304-C6 BHS-Modell bei der Untersuchung der Translokation von Arzneistoffen als eine selektive Barriere und ist damit bestens geeignet für die Untersuchung von Wirkstoffen gegen ZNS-invasive Pathogene.

Die Durchführung erfolgreicher Transmigrationsuntersuchungen an BHS-Modellen wie in dieser Arbeit legt die Grundlage für die Verbesserung und Neuentwicklung von Therapien neuroinvasiver Infektionserkrankungen.

## 2 EINLEITUNG

Infektionserreger sind 80 Jahre nach der Entdeckung des Penicillins von Alexander Flemming immer noch ein wesentlicher Grund für den Verlust an gesunden Lebensjahren. Laut dem jährlichen Bericht des European Centre for Disease Prevention and Control ist der Anstieg an Infektionserkrankungen mit multiresistenten Keimen eine immer größer werdende Gefahr für die öffentliche Gesundheit (ECDC, 2010). Weltweit gesehen, sind Infektionen des Respirationstraktes und Durchfallerkrankungen die Hauptursache für den Tod von Kindern unter fünf Jahren (WHO, 2009b). Pneumokokken besiedeln beispielsweise den Respirationstrakt als Teil der Normalflora, können aber unter bestimmten Bedingungen als Pathogene lebensbedrohliche invasive Erkrankungen auslösen. In tropischen Regionen wie in Afrika oder Südamerika haben weiterhin auch parasitäre Erkrankungen einen großen Einfluss auf die Gesundheit der Bevölkerung und im Fall von Trypanosomenerkrankungen auch auf die Landwirtschaft. Humanpathogene Trypanosomen sind die Erreger der afrikanischen Schlafkrankheit. Sie vermehren sich im Blutstrom, können die Bluthirnschranke (BHS) überwinden und das zentrale Nervensystem (ZNS) infizieren. Trypanosomen beeinflussen im Gehirn den Schlaf-Wachzyklus und unbehandelt fällt der Infizierte schließlich in einen komatösen Zustand, der in jedem Fall tödlich endet. Pneumokokken sind ebenfalls in der Lage über die BHS zu transmigrieren. Derartige ZNS-Infektionen sind lebensbedrohlich und können trotz Behandlung schwere und lebenslange Folgeschäden verursachen. Die Pathomechanismen einer ZNS-Infektion, insbesondere die Überwindung der BHS sind bisher nur wenig verstanden. Die Behandlung von ZNS-Infektionen ist ebenfalls schwierig, da die meisten Medikamente die BHS nicht überwinden können. *In vitro* Modellsysteme der BHS bieten die Möglichkeit, die Transmigration von Pathogenen und die Permeation von Arzneistoffen über die BHS genauer zu untersuchen. Weiterhin eröffnet sich die Möglichkeit mittels Inhibitoren in den Transmigrationsprozess einzugreifen. Mit einem besseren Verständnis der zellulären und molekularen Mechanismen wird schließlich der Grundstein für Verbesserungen in der Therapie und für die Entwicklung neuer Medikamente gelegt.

## 2.1 DIE BLUT-HIRNSCHRANKE

Das zentrale Nervensystem (ZNS), das aus dem Gehirn und dem Rückenmark besteht, wird durch drei Barrieren zu einem besonders geschützten Kompartiment. Durch die intravenöse Injektion von beispielsweise radioaktiv markiertem Histamin wird dieses Kompartiment als einzig unkontrastiertes Areal in einem Autoradiogramm sichtbar (**Abb. 2.1**).

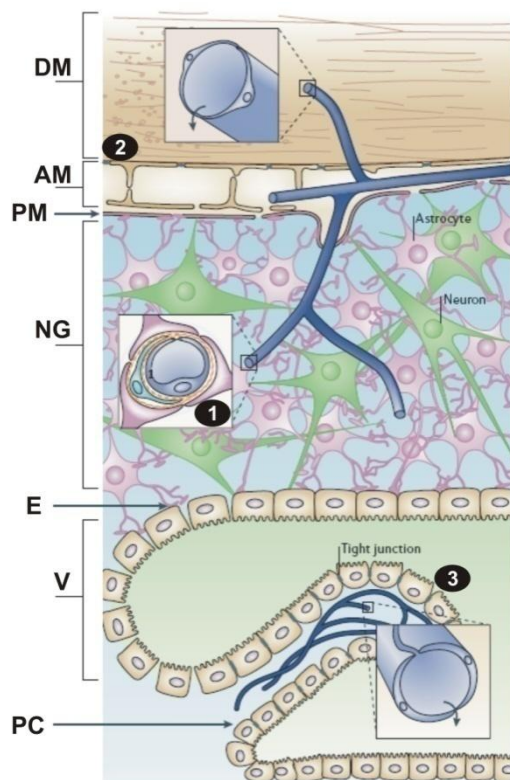


**Abb. 2.1:** Negativdarstellung des ZNS  
Ganzkörperautoradiogramm einer Maus, der radioaktiv markiertes Histamin intravenös injiziert wurde. Alle Strukturen, bis auf das ZNS, werden angefärbt.

Quelle: Abb. 1a aus (Pardridge, 2003)

Schon im Jahr 1885 entdeckte Paul Ehrlich, dass sich das Gehirn nicht anfärbte, als er einigen Versuchstieren verschiedene Farbstoffe

intravenös injizierte. Er folgerte daraus, dass es eine Barriere zwischen Blut und Gehirn gibt (Ehrlich, 1885). Appliziert man hingegen einen Farbstoff in das ZNS, so färbt er auch nur dieses an (Goldmann, 1913). Nach außen wird dieses Kompartiment von der Meninx encephali (Gehirnhaut) abgegrenzt (**Abb. 2.2**). Diese unterteilt sich in drei Schichten: Direkt unter der



**Abb. 2.2:** Barrieren im ZNS

Die Gehirnhaut besteht aus **DM**= Dura mater, **AM**= Arachnoidea mater und **PM**= Pia Mater; **NG**= Nervengewebe, **PC**= Plexus choroideus, **V**= Ventrikel, **E**= Ependym. Epithelien mit Barrierefunktion: **1**= Endothel der Kapillaren, **2**= AM, **3**= E; Zirkumventrikuläre Organe nicht gezeigt. Verändert nach (Abbott et al., 2006)

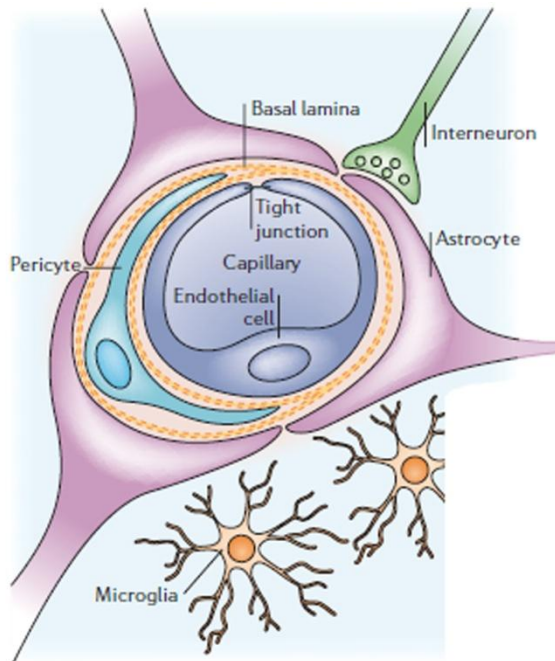
Schädeldecke befindet sich die Dura mater (harte Hirnhaut), darunter die Arachnoidea mater (Spinnenwebshaut) als physiologische Barriere und schließlich die Pia mater (weiche innere Hirnhaut) (Lippert, 2003). Im inneren zentralen Bereich des Gehirns liegen die Ventrikel. Dort übernimmt das Ependym die Barrierefunktion. Die Kapillaren der Blutgefäße bilden eine dritte physiologische Barriere und trennen auf diese Weise den Blutstrom von der interstitiellen Flüssigkeit des Nervengewebes. Diese Barriere wird als Blut-Hirnschranke (BHS) bezeichnet (Klinke *et al.*, 2003). Auf diese Weise kann das exakt definierte Milieu im Gehirn stabil gehalten werden. Diese Homöostase ist für die Gehirnfunktion essentiell. An einigen Stellen im Gehirn fehlt die BHS und wird durch andere Barrieren ersetzt. Diese Regionen sind der Plexus choroideus (**Abb. 2.2**) und

die zirkumventrikulären Organe (CVOs). Dort ist das Gewebe stark vaskularisiert und das Kapillarendothel ist fenestriert. Unter Fenestrierung versteht man Bereiche ohne Plasmamembran, die nur aus einer Glykokalyx bestehen, aber immer noch für Blutplasmae Proteine undurchlässig sind (Benninghoff & Drenckhahn, 2004). In den CVOs wird die BHS durch eine Gliazellbarriere ersetzt. In den Bereichen des Plexus choroideus übernimmt das Epithel die Barrierefunktion und sezerniert den Liquor cerebrospinalis (cerebrospinale Flüssigkeit; CSF). Dieser Bereich wird als Blut-CSF-Schranke bezeichnet. Über das Ependym gelangt die CSF in das Nervengewebe und wird über das subarachnoidale Lumen, den Bereich zwischen Pia mater und Arachnoidea mater, wieder resorbiert (Abbott *et al.*, 2006; Klinker *et al.*, 2003; Ransohoff *et al.*, 2003). Von allen drei Barrieren hat die BHS mit einer Oberfläche von bis zu 20 m<sup>2</sup> die größte Austauschfläche. Das Kapillarnetz ist fein verästelt, hat eine geschätzte Gesamtlänge von über 600 km und der mittlere Abstand zwischen zwei Kapillaren beträgt ~40 µm. Eine BHS-gängige Substanz braucht 1 s, um diese Distanz mittels Diffusion zu überwinden. Damit übernimmt die BHS wichtige Aufgaben in den Bereichen Stoffaustausch und ZNS-Sicherheit (Cserr *et al.*, 1978; Pardridge, 2003).

### 2.1.1 AUFBAU UND FUNKTION

Bei allen Säugetieren entsteht die BHS während der pränatalen Ontogenese (Abbott, 2005) und erfährt bei der Geburt einen deutlichen Anstieg der Barrierefunktion (Butt *et al.*, 1990). Während der Grundphänotyp des Endothels von eher permeabler Natur ist, entsteht durch Induktionsprozesse in den Gehirnendothelzellen eine besonders dichte Barriere. Wesentliche Charakteristika sind die starke Ausbildung der Zonula occludens oder „tight junctions“ (TJ) und die Verringerung der Pinocytoserate (Huber *et al.*, 2001). Die Endothelzellen sind im Gehirn mit einer Reihe von anderen Zellen assoziiert (**Abb. 2.3**). Auf der basalen Seite sind die Endothelzellen von einer extrazellulären Matrix (ECM), der Basallamina, umgeben. In diese sind Perizyten eingebettet. Die Endfüße von Astrozyten umschließen sowohl die Perizyten als auch die Endothelzellen, mit welchen sie in besonders engen Kontakt treten. Weiterhin können Mikroglia als Makrophagen des Gehirns sowie Ausläufer von Neuronen assoziiert sein. Unter allen beteiligten Zellen besteht ein Netzwerk gegenseitiger Einflussnahme, sodass man in diesem Zusammenhang auch von dem glio- oder neurovaskulären Komplex spricht (Cardoso *et al.*, 2010; Wolburg *et al.*, 2009). Die Astrozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der BHS-Integrität (Abbott *et al.*, 2006). Induktionsprozesse führen in den

Endothelzellen zu dichteren TJs (Dehouck *et al.*, 1990; Hurst & Fritz, 1996; Janzer & Raff, 1987). Bestimmte Transportsysteme wie das P-Glykoprotein (Pgp) (Schinkel, 1999) oder der Glukosetransporter 1 (GLUT1) (McAllister *et al.*, 2001) werden ebenso wie spezialisierte Enzymsysteme exprimiert und spezifisch lokalisiert (Easton & Abbott, 2002). Astrozyten bilden im Bereich ihrer Endfüßchen spezielle Strukturen aus, die „orthogonal array of



**Abb. 2.3:** Zellen der Blut-Hirnschranke

Endothelzellen (EC) bilden die Kapillaren und sind untereinander über tight junctions (TJ) verbunden. Die EC werden von einer Basallamina umhüllt, in die Perizyten eingebettet sind. Perivaskuläre Astrozyten-Endfüßchen bedecken einen Großteil der Oberfläche. Weitere beteiligte Zellen sind Ausläufer von Neuronen und Mikroglia, inflammatorische Immunzellen des ZNS.

Aus Abb. 2 (Abbott *et al.*, 2006)

intramembranous particles“, kurz OAPs, genannt werden (Wolburg, 1995). Bestandteile dieser sind beispielsweise das Wasserkanalprotein AQP4 (aquaporin 4) oder der Kaliumkanal Kir4.1 (Potassium inwardly-rectifying channel). Die Induktion dieser Strukturen ist abhängig von der umgebenden ECM. Beispielsweise induziert Laminin *in vitro* die Aggregation von Kir4.1 und AQP4 über den Dystrophin-Dystroglykankomplex (Guadagno & Moukhles, 2004). Laminine sind heterotrimere Glykoproteine ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Ketten) und haupt-sächlicher Bestandteil von Basallaminae. Während die Basallamina der Endothelzellen die Laminine 8 ( $\alpha 4 \beta 1 \gamma 1$ ) und 10 ( $\alpha 5 \beta 1 \gamma 1$ ) enthält, findet sich in der Basallamina der Astrozyten Laminin 1 ( $\alpha 1 \beta 1 \gamma 1$ ) und 2 ( $\alpha 2 \beta 1 \gamma 1$ ) (Sixt *et al.*, 2001). Die unterschiedliche

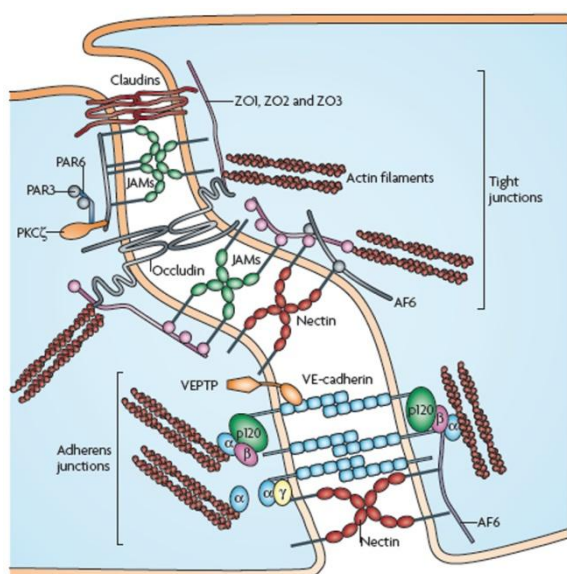
Zusammensetzung der Basallaminae kann Auswirkungen auf die Permeabilität beispielsweise für Leukozyten haben (Sixt *et al.*, 2001; Wolburg *et al.*, 2009). Weitere Bestandteile der ECM sind beispielsweise Strukturproteine wie Kollagen IV und Elastin aber auch Fibronektin, Entactin oder Nidogen (Nag, 2003). Diese Bestandteile sind in eine Proteoglykanmatrix eingebettet. Endothelzellen und Astrozyten sezernieren das Heparansulfat Proteoglykan Agrin, das sich auf die BHS-Integrität positiv auswirkt (Smith & Hilgenberg, 2002). Über ECM-Adhäsionsrezeptoren (CAMs, Integrine) werden die Zellen in der ECM verankert. Daher kann ein Ab- oder Umbau der Basallamina beispielsweise durch Matrix-Metalloproteasen (MMPs)



zu Veränderungen im Zytoskelett führen, was sich wiederum auf die TJs auswirken kann (Cardoso *et al.*, 2010).

Perizyten bedecken 22-32 % der Kapillarendothelzellen (Kim *et al.*, 2006) (**Abb. 2.3**). Sie spielen sowohl eine Rolle bei der Morphogenese kleiner Blutgefäße (Wolburg *et al.*, 2009) als auch bei der Aufrechterhaltung der Gefäßstruktur und der BHS-Integrität (Braun *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2005). Perizyten bilden die meisten Komponenten der Basallamina und kommunizieren mit den Endothelzellen direkt über „gap junctions“ (Allt & Lawrenson, 2001) oder über lösliche Faktoren (Bagley *et al.*, 2005). Mikroglia residieren im perivaskulären Raum und spielen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort (**Abb. 2.3**). Bei Aktivierung werden sie zu phagozytierenden Zellen und inflammatorischen Effektoren (Ransohoff & Perry, 2009). Über den direkten Einfluss von Neuronen auf die BHS ist kaum etwas bekannt (Cardoso *et al.*, 2010).

Auf der molekularen Ebene werden die Endothelzellen durch TJs und adherence junctions (AJs) zusammengehalten (Abbott *et al.*, 2006) (**Abb. 2.4**). Der netzartige Komplex aus TJ



**Abb. 2.4:** BHS Zell-Zellverbindungen

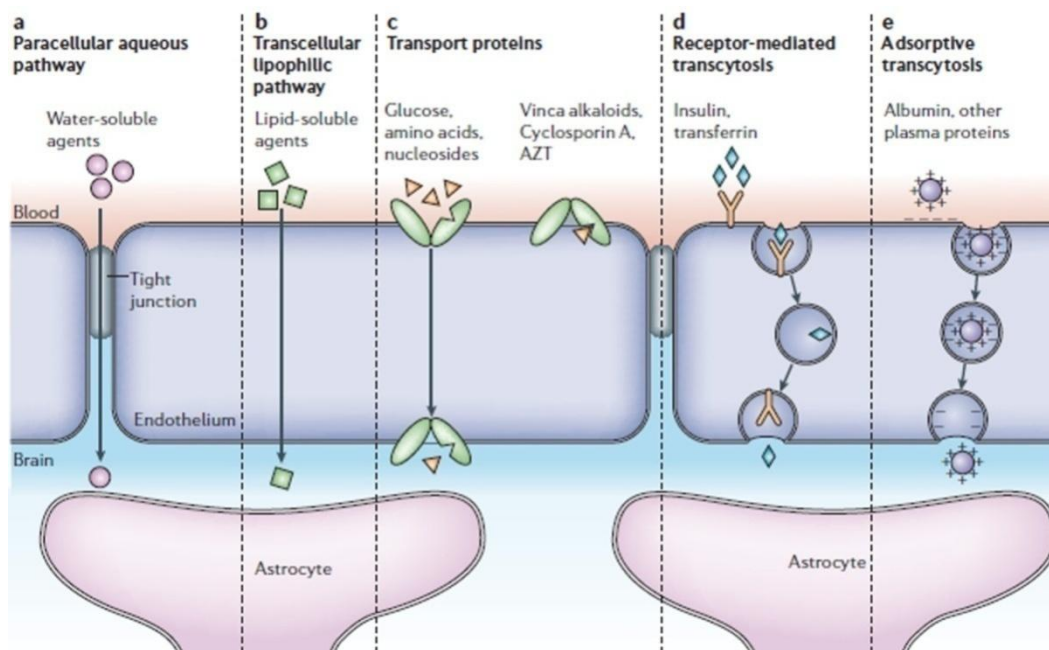
**Tight Junctions** werden von Claudinen, Occludinen und JAMs (junctional adhesion molecules) gebildet. Über Adaptorproteine wie ZO1-3 werden Verbindungen zum Aktinzytoskelett geknüpft. Proteine für Zellpolarität (PAR3, -6) und Signaltransduktion (PKC $\zeta$ ) sind auch Teil des Komplexes. **Adherens Junctions** bestehen aus VE- (vascular endothelial) Cadherinen, die ebenfalls über Brückenmoleküle wie verschiedene Catenine (p120,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) mit Aktinfilamenten verbunden werden. Nectine, gekoppelt über AF6, sind in beiden Zell-Zellverbindungsarten vorhanden.

Aus Abb. 1b in (Lemichiez *et al.*, 2010)

Proteinen zwischen zwei Zellen ist derart eng, dass sogar der parazelluläre Fluss von Ionen unterbunden wird. Dies lässt sich als transendothelialer elektrischer Widerstand (TEER) messen. Während das Endothel im restlichen Körper TEER Werte von 2-20  $\Omega$  /cm<sup>2</sup> erreicht, werden an der BHS Werte von bis zu 1000  $\Omega$  /cm<sup>2</sup> gemessen (Butt *et al.*, 1990). Grund für diese Barrierefunktion ist die Interaktion von Claudinen benachbarter Zellen (Hirase *et al.*, 1997). Das strukturell verwandte Occludin hilft bei der Strukturbildung (Persidsky *et al.*, 2006). Die „junctional adhesion molecules“ 1-3 (JAM1-3) sind ebenfalls Teil der TJs und tragen zur Stabilität bei (Abbott *et al.*, 2006), sind aber bisher nur wenig untersucht (Cardoso *et al.*, 2010). Brückenmoleküle wie zonula occludens Proteine 1-3 (ZO1-3)

veknüpfen die Transmembranproteine mit dem Aktinzytoskelett. Intrazellulär entstehen Proteinkomplexe und bisher wurden 40 verschiedene akzessorische Proteine gefunden, darunter auch Proteine der Signaltransduktion und der Zellpolarität (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2003; Lemichez *et al.*, 2010). Die starke Quervernetzung und die Beteiligung in Signaltransduktionsprozessen charakterisieren TJs als dynamische Strukturen, die stark reguliert sind (Lemichez *et al.*, 2010). Neben den apikalen TJs vermitteln die lateral unterhalb gelegenen AJ Zell-Zellverbindungen und tragen zur Endothelstabilität bei (Abbott *et al.*, 2006). Das „vascular endothelial“ (VE-) Cadherin wird intrazellulär über verschiedene Catenine an das Aktinzytoskelett gebunden (**Abb. 2.4**). Weitere Zell-Zellbindungsmoleküle sind Nectine, die sowohl Teil der TJs als auch Teil der AJs sind (Lemichez *et al.*, 2010), sowie das „platelet endothelial cell adhesion molecule“ (PECAM) und dessen nachgeschaltete Signaltransduktionskaskade (Cardoso *et al.*, 2010).

TJs polarisieren das Endothel in apikal und basolateral und ermöglichen die gezielte und asymmetrische Verteilung von Transportproteinen und Enzymkomplexen, einem weiteren wichtigem Charakteristikum der BHS. Somit ist die BHS nicht nur eine physikalische, sondern



**Abb. 2.5:** Transportwege über die BHS

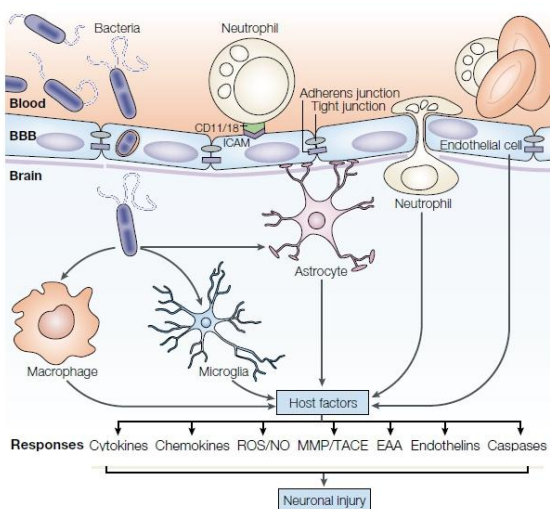
Der Transport wasserlöslicher Substanzen wird unter physiologischen Umständen vollständig unterbunden (**a**). Lipophile Stoffe sind membrangängig und können durch Diffusion in das ZNS gelangen, wie z. B. viele Arzneistoffe, die für das ZNS bestimmt sind (**b**). Spezifische Transportsysteme wie GLUT1 für Glukose oder LAT1 für große, neutrale Aminosäuren versorgen das Gehirn mit Nährstoffen. Auf diese Weise können auch Substanzen aktiv aus dem Gehirn ausgeschleust werden. Z. B. schleust das Mrp1 (Multidrug resistance associated protein) viele unpolare Substanzen wie Arzneistoffe aus Endothelzellen heraus (**c**). Über rezeptorvermittelte Transzytose werden gezielt Plasmaproteine wie Insulin über Rezeptoren gebunden und über die Barriere transportiert (**d**). Moleküle mit zahlreichen positiven Ladungen können über adsorptive Transzytose ins Gehirn gelangen (**e**). Aus (Abbott *et al.*, 2006)

auch eine metabolische Barriere (Abbott *et al.*, 2006). Einen Überblick gibt **Abb. 2.5**. Außer in den Bereichen der ZVO und des Plexus choroideus unterbinden die TJs den parazellulären Austausch von kleinen polaren Substanzen. Gase und lipophile Moleküle können die BHS frei passieren (Abbott *et al.*, 2006). Für den gezielten Austausch von Ionen gibt es verschiedene Transporter, beispielsweise den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter oder den  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Symporter (Wolburg *et al.*, 2009). Ein spezieller Transporter zerebraler Endothelzellen ist auch GLUT1, der die Versorgung des Gehirns mit Glukose sicherstellt. (Persidsky *et al.*, 2006). Weiterhin kommen in den Endothelzellen Caveolae vor, die als spezialisierte Vesikel im Zusammenhang mit Endozytose, Transzytose und Signaltransduktion stehen. Caveolin-1 ist das Hauptstrukturprotein der Caveolae (Huber *et al.*, 2001). Es kommt auch in Astrozyten und Perizyten vor (Virgintino *et al.*, 2002) und kann Cholesterol und Fettsäuren binden (Wolburg *et al.*, 2009). Da es mit Occludin und ZO-1 assoziiert sein kann (Smith & Gumbleton, 2006), vermutet man einen Einfluss auf die TJs, der aber noch kontrovers diskutiert wird (Nag *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2007). In den Membranen des zerebralen Endothels sind auch ATP abhängige ABC-Transporter lokalisiert. Besonders Pgp und das „multidrug resistance associated protein“ 1 (MRP-1) sind dafür bekannt, dass sie effektiv eine Vielzahl von Substanzen und Arzneistoffen aus dem Gehirn gegen den Konzentrationsgradienten ausschleusen, weshalb sie im Fokus der pharmazeutischen Industrie stehen (Abbott *et al.*, 2006; Cardoso *et al.*, 2010). Schließlich werden auch gezielt bestimmte Substanzen über rezeptorvermittelte Endozytose in das ZNS importiert. Binden Liganden wie beispielsweise Insulin und Transferrin an ihre Rezeptoren, wird ein Transzytoseprozess ausgelöst (Abbott *et al.*, 2006).

Die BHS sorgt für die Aufrechterhaltung der Homöostase im ZNS und übernimmt eine wesentliche Schutzfunktion vor den meisten Toxinen und Pathogenen. Sie ist eine streng regulierte Barriere zwischen Blutstrom und CSF aber auch ein dynamisches System, das an veränderte Bedingungen angepasst werden kann.

### 2.1.2 INFEKTIÖSE ERKRANKUNGEN DES ZNS

Einigen Krankheitserregern ist es möglich, die Schutzbarrieren des ZNS zu überwinden und eine Infektion dessen auszulösen. Man spricht von einer Meningitis, wenn die Gehirnhäute betroffen sind und von einer Enzephalitis, wenn das Gehirn betroffen ist. Sind Gehirn und Meningen involviert, wird die Infektion als Meningoenzephalitis bezeichnet. In vielen Fällen gelangen die Infektionserreger zuerst in den Blutstrom, verursachen eine Bakteriämie oder systemische Infektion und transmigrieren dann über die BHS ins ZNS. Nicht hämatogene Infektionswege sind selten, können aber bei Infektionen benachbarter Gewebe, z. B. einer Sinusitis, oder bei Verletzungen des Schädels und chirurgischen Eingriffen erfolgen (Kim, 2003). Neben Viren, Bakterien und eukaryontischen Pathogenen können auch Prionen das



**Abb. 2.6: ZNS-Schädigung durch Wirtsfaktoren**  
Auf bakterielle ZNS-Invasion reagieren zunächst Astrozyten, Mikroglia und Endothelzellen. Durch proinflammatorische Faktoren angelockt, transmigrieren Leukozyten wie Makrophagen und Neutrophile. Zahlreiche Wirtsantworten erfolgen, von denen vor allem bestimmte Zytokine, ROS/NO und EAA zur neuronalen Schädigung beitragen. **ROS**= Reactive Oxygen Species; **MMP**= Matrix-Metalloproteasen; **TACE**= TNF $\alpha$  Converting Enzyme; **EAA**= Excitatory Amino Acids.  
Verändert nach (Kim, 2003)

Gehirn infizieren, was zu einer spongiformen Enzephalopathie führt. Beispiele für virale Infektionserreger sind das Frühsommer-Meningoenzephalitis Virus (FSME) und das humane Immundefizienzvirus (HIV). Bei HIV-Infektionen kann es beispielsweise zu ZNS-Koinfektionen mit *Cryptococcus neoformans* kommen. Durch die HIV-Infektion bedingte T-Zelldefizienz kann das Immunsystem den

Pilzbefall nicht mehr ausreichend bekämpfen und die Infektion endet ohne Behandlung tödlich (Pulzova *et al.*, 2009). Eine bakterielle Meningitis wird neonatal hauptsächlich von *Streptococcus agalactiae*, *E. coli* K1 und *Listeria monocytogenes* und post neonatal hauptsächlich von *S. pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* und *Haemophilus influenzae* Typ b

hervorgerufen (Kim, 2003). Innerhalb des Blutes kommt es als Reaktion auf die Pathogene zu proinflammatorischen Prozessen, die die BHS schwächen (**Abb. 2.6**) (Kim, 2003). TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  beeinflussen die Barrierefunktion (Abbott *et al.*, 2006) und wirken sich unterschiedlich auf verschiedene Pathogene aus (Nikolskaia *et al.*, 2008). Überwinden die Pathogene die BHS und vermehren sich, kommt es zum vermehrten Auftreten weißer Blutzellen in der

Gehirnflüssigkeit. Eine solche Pleozytose ist auch bei der Diagnose der afrikanischen Schlafkrankheit ein Anzeichen auf eine trypanosomale ZNS-Infektion (Kennedy, 2008). Das Vorhandensein von Pathogenen im ZNS führt zu einer durch freigesetzte Toxine der Infektionserreger zu Gewebeschäden. Beispielsweise wirkt das Pneumolysin der Pneumokokken zelllytisch und steht im Zusammenhang mit der bei einer Pneumokokkenmeningitis oftmals auftretenden Taubheit (Marriott *et al.*, 2008). Zum anderen werden durch eine starke proinflammatorische Immunreaktion „reactive oxygen species“ (ROS) sezerniert und proteolytische Enzyme aktiviert, die die umgebenden Gewebe angreifen (He, 2010) (**Abb. 2.6**). ZNS-Infektionen haben eine hohe Sterblichkeit und Überlebende leiden oftmals an dauerhaften Folgeschäden, wie Lähmungserscheinungen, halbseitige Körperlähmung, Krampfanfälle sowie Seh- und Hörverlust (Tebruegge & Curtis, 2008).

### 2.1.3 MODELLSYSTEME

Es gibt zahlreiche BHS-Modellsysteme, die unterschiedlich komplex sind. Zwar gilt im Allgemeinen, dass ein Modellsysteme umso näher an der *in vivo* Situation ist, je komplexer es ist, aber die Qualität eines experimentellen Systems hängt auch davon ab, welche Fragestellungen sich damit beantworten lassen. *In vivo* Modelle ermöglichen eine Untersuchung der BHS-Funktion im Kontext des gesamten Körpers, erfordern jedoch aufwendige Tierversuche. Bei sogenannten *ex vivo* Ansätzen werden Gewebeproben aus Tier und Mensch direkt untersucht oder dienen der Gewinnung von primären Zellen oder Zelllinien. *In vitro* Ansätze verwenden Zellen in einer artifiziellen Umgebung. In diesem Bereich gibt es komplexe 3D-Modelle (Cucullo *et al.*, 2007; Parkinson *et al.*, 2003; Stanness *et al.*, 1997) und verschiedene Zellarten, die in Transwellsystemen alleine oder miteinander kombiniert verwendet werden. Das einfachste System besteht aus einer Zelllinie, die in einem Gefäß ausgesät wird und sich zur Analyse von Adhäsion und Invasion in Endothelzellen eignet. Auf diese Weise wurden Studien mit primären isolierten HBMEC (human brain microvascular endothelial cells) und potentiellen Pathogenen wie *E. coli* (Stins *et al.*, 1999) und *Citrobacter freundii* (Badger *et al.*, 1999) durchgeführt. Die HBMECs wurden durch Transfektion mit SV40-LT (simian virus 40 large T antigen) in eine Zelllinie umgewandelt (Stins *et al.*, 2001) und werden als Infektionsmodell auch im Transwellsystem eingesetzt, beispielsweise mit *Borrelia burgdorferi* (Grab *et al.*, 2005) oder *T. brucei* Stämmen (Grab *et al.*,

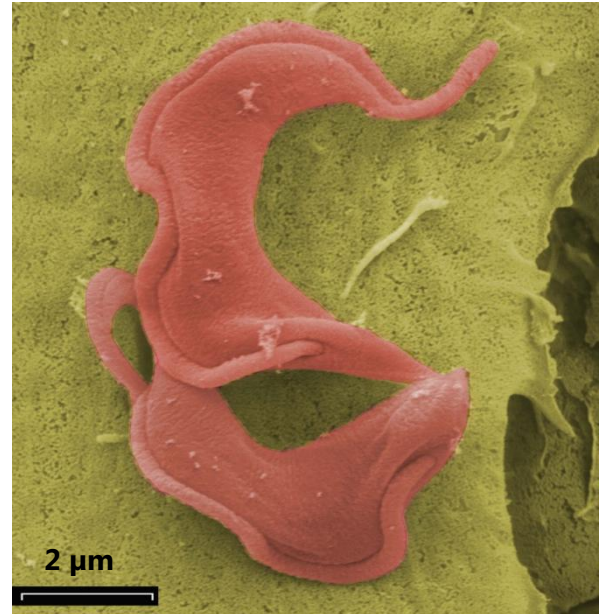
2004; Nikolskaia *et al.*, 2006a; Nikolskaia *et al.*, 2006b; Nikolskaia *et al.*, 2008). Im Transwellsystem kann der Transmigrationsprozess in seiner Gesamtheit untersucht werden. Die Verwendung von Transwelleinsätzen ermöglicht die Kombination von Endothelzellen mit bestimmten ECM-Komponenten oder anderen Zellarten. So kombinierten Hurst und Fritz die humane endothelartige Zelllinie ECV304 in Kollagen-1 beschichteten Transwelleinsätzen mit C6-Astrozyten aus der Ratte und stellten fest, dass die Astrozyten eine Verstärkung der Barrierefunktion induzierten (Hurst & Fritz, 1996; Kuchler-Bopp *et al.*, 1999). Nakagawa und Kollegen kombinieren drei Zelltypen in ihrem Modellsystem aus primär isolierten Endothelzellen, Astrozyten und Perizyten aus der Ratte in Kollagen-1 beschichteten Transwelleinsätzen (Nakagawa *et al.*, 2007; Nakagawa *et al.*, 2009). Die parazelluläre Impermeabilität ist ein wesentliches Kriterium für ein BHS-Modell und kann auf verschiedene Wege untersucht werden. Eine Möglichkeit ist die Verwendung von Diffusionsmarkern wie Evans-Blue-Albumin (EBA). Allerdings kann derselbe Transwelleinsatz nicht für die EBA-Messung und die Transmigrationsuntersuchung eingesetzt werden (Untucht, 2007). Bei anderen Diffusionsmarkern wie im Fall von radioaktiv markierter [ $C^{14}$ ]Sucrose sind aufwendige Nachweissysteme notwendig. Eine weitere Möglichkeit ist die Messung des TEER, jedoch variieren die oftmals verwendeten Chopstickelektroden während der Messung bezüglich des relativen Abstands der Elektroden, dem Eintauchwinkel, der Eintauchtiefe und der relativer Position zur Endothelzellschicht (Reichel *et al.*, 2003). Auch sind Werte aus verschiedenen Laboren schwer zu vergleichen (Deli *et al.*, 2005). Für Infektionsstudien interessant ist die Verwendung eines Bakterienstammes, z. B. *E. coli* HB101, der von sich aus nicht die BHS überwinden kann und somit als „Negativkontrolle“ dient (Huang *et al.*, 1995; Kim, 2000; Stins *et al.*, 1999).



## 2.2 TRYPANOSOMEN

Trypanosomen gehören zu den flagellierten Protozoen und sind einzellige Parasiten bei Wirbeltieren, die von Insekten hauptsächlich in tropischen und subtropischen Ländern übertragen werden (Despommier *et al.*, 2005; Hahn *et al.*, 2004). Sie sind 16-42 µm lang (Mehlhorn, 2004) und zeigen unter dem Mikroskop ihren namensgebenden Habitus (**Abb.**

**2.7**). Sie bewegen sich schlängelnd und um die eigene Achse rotierend. Übersetzt bedeutet ihr Name Bohrkörper aus dem griechischen *to trýpanon*, der Bohrer, und *to sóma*, der Körper (Hentschel & Wagner, 1996). Zusammen mit den nahe verwandten Leishmanien gehören sie zur Ordnung der Kinetoplastida und zeichnen sich durch ein spezielles Organell, den Kinetoplasten, aus (2.2.4). Als eukaryontische Parasiten sind sie Erreger zahlreicher Infektionskrankheiten bei Tieren und Menschen (Tab. 2.1). Tödliche Trypanosomeninfektionen kommen bei Tieren



**Abb. 2.7:** *T. brucei brucei*

Trypanosomen (rot) auf C6-Gliazellen (gelb). EM-Aufnahme von Prof. M. Rohde, eigene Kolorierung.

besonders in Afrika bei den Nutztieren des Menschen wie Pferde, Rinder, Schweine, Ziegen und Schafe vor (2.2.1). Apathogene Arten sind weltweit verbreitet und Infektionen mit diesen bleiben i.d.R. latent und inapparent. Allerdings stehen besonders starke Infektionen im Verdacht, bei Rindern Aborte, Anämie und ZNS-Störungen zu verursachen. Weiterhin können bestimmte Trypanosomenarten auch bei Fischen und Vögeln vorkommen (Eckert *et al.*, 2008; Mehlhorn, 2004). Für Menschen sind zwei Trypanosomenarten gefährlich: Die Art *T. cruzi* verursacht in Mittel- und Südamerika die Chagaskrankheit (2.2.2). Die afrikanische Schlafkrankheit (2.2.3) hingegen wird von den zwei Unterarten *Trypanosoma brucei gambiense* und *T. b. rhodesiense* ausgelöst. Laut Weltgesundheitsorganisation gehören diese Krankheiten zu den „neglected tropical diseases“ (vernachlässigte tropische Krankheiten), die in den tropischen und subtropischen Ländern vorkommen und für die keine effizienten Diagnosemethoden oder Therapiemöglichkeiten vorhanden sind. Schlechte hygienische Verhältnisse und politische Instabilität sind oftmals weitere Gründe für die hohen Krankheits- und Sterberaten (WHO, 2010).

**Tab. 2.1: Relevante parasitierende Trypanosomenarten**

Spezies	Wirt	Krankheit	Vektor	Übertragung	Vorkommen
<i>T. brucei brucei</i>	Pferde, Schweine, Rinder, Nagetiere	Nagana	Tsetse-Fliegen	Biss	Tropisches Afrika
<i>T. b. gambiense</i>	Menschen, Affen, Hunde, Schweine, Antilopen,...	Schlafkrankheit	Tsetse-Fliegen	Biss	Westafrika
<i>T. b. rhodesiense</i>	Menschen, Schweine, Wild	Schlafkrankheit	Tsetse-Fliegen	Biss	Ostafrika
<i>T. congolense</i>	Rinder, Haustiere	Nagana	Tsetse-Fliegen	Biss	Kongo, Südafrika
<i>T. simiae</i>	Schafe, Ziegen, Schweine, Affen	Virulente Trypanosomiasis	Tsetse-Fliegen	Biss	Ostafrika
<i>T. vivax</i>	Pferde, weitere Wiederkäuer	Nagana	Tsetse-Fliegen	Biss	Tropisches Afrika
<i>T. evansi</i>	Pferde, Hunde, Wiederkäuer	Surra	Bremsen, Stechfliegen	Biss	Indien, Afrika, Sibirien, Australien
<i>T. equinum</i>	Pferde, Rinder, Wasserschweine	Mal de Caderas	Bremsen	Biss	Süd- und Mittelamerika
<i>T. equiperdum</i>	Pferde	Beschälseuche	kein	sexuell	Mediterrane Gebiete, Indien, Amerika
<i>T. cruzi</i>	Menschen, Haus- und Wildtiere	Chagas	Raubwanzen	Fäzes	Südamerika
<i>T. rangeli</i>	Menschen, Ratten	apathogen	Raubwanzen	Biss, Fäzes?	Südamerika
<i>T. theileri</i>	Rinder	apathogen	Bremsen	Fäzes	weltweit
<i>T. melophagium</i>	Schafe	apathogen	Lausfliegen	Fäzes	weltweit
<i>T. lewisi</i>	Ratten	apathogen	Rattenfloh	Fäzes	weltweit

Ins Deutsche übernommen aus (Mehlhorn, 2004)

## 2.2.1 AFRIKANISCHE TRYPANOSOMIASIS DER TIERE

Haustiere, Nutztiere und Wildtiere können mit unterschiedlichen Trypanosomenarten infiziert werden (Tab. 2.1). Die Krankheit führt bei Nutztieren zu Fieber und Anämie und in der chronischen Phase zu Gewichtsverlust, Lethargie und schließlich oftmals zum Tod durch Herzversagen (Naessens, 2006) (**Abb. 2.8**). Infizierte Wildtiere hingegen zeigen eher milde bis asymptomatische Krankheitsverläufe (Steverding, 2008). Besonders groß sind die Auswirkungen der Trypanosomenerkrankungen auf die Viehzucht und insbesondere die Rinderhaltung, die in weiten Teilen Afrikas durch die bovine Trypanosomiasis, auch bekannt unter dem Namen „Nagana“, extrem erschwert wird. Der daraus entstehende Schaden wird



auf über eine Milliarde US-Dollar geschätzt (Kristjanson, 1999). Allerdings sind nicht alle Rinderarten gleichermaßen von der Seuche betroffen. Arten wie das N'Dama, die sich von *Bos taurus* ableiten, gelten als trypanotolerant. Hingegen sind Arten, die von *Bos indicus* abstammen wie das Zebu wesentlich empfänglicher für Trypanosomeninfektionen (Murray *et al.*, 1982). Als Trypanotoleranz bezeichnet man die Fähigkeit von Nutztieren trotz Trypanosomeninfektion an Gewicht zu gewinnen und fortpflanzungsfähig zu bleiben (Naessens, 2006). Nagana wird von drei Trypanosomenarten verursacht, die wie die humanpathogenen Arten von Tsetsefliegen übertragen werden. *T. congolense* und *T. vivax* besiedeln als intravaskuläre Parasiten nur das Blutgefäßsystem der Rinder. Die dritte Art, *T. brucei brucei*, kann das über das Gefäßendothel transmigrieren und Gewebe



**Abb. 2.8:** Nagana bei Nutztieren  
Extremer Gewichtsverlust als Folge einer Trypanosomeninfektion. (IAEA, 2004)

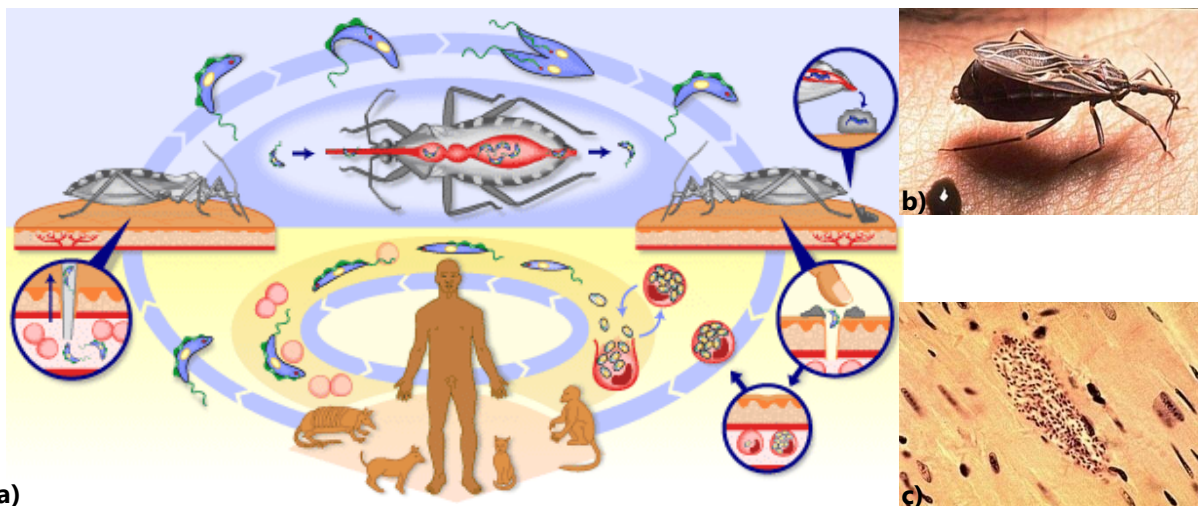
infizieren (Losos & Ikede, 1972). Sind Rinder allerdings gleichzeitig von *T. congolense* und *T. b. brucei* infiziert, können beide Arten das ZNS infizieren (Masake *et al.*, 1984). Rinder sind auch ein wichtiges Reservoir für *T. b. rhodesiense* und in der Hälfte aller Fälle entwickeln sich fatale ZNS-Infektionen (Naessens, 2006; Picozzi *et al.*, 2005). Für *T. vivax* konnte gezeigt werden, dass die Parasiten die BHS von Ziegen überwinden können (Jennings *et al.*, 1979). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Fähigkeit die BHS zu transmigrieren von der Trypanosomenart und dem jeweiligen Wirt abhängt. Eine Infektion des ZNS erschwert die Behandlung der Tiere, da die wenigsten Medikamente die BHS passieren können (Naessens, 2006).

### 2.2.2 CHAGASKRANKHEIT

Die Chagaskrankheit, die nach ihrem Entdecker und Arzt Carlos Chagas benannt wurde, ist auch unter den Namen „American Trypanosomiasis“ oder „New World Trypanosomiasis“ bekannt. Der Krankheitserreger *Trypanosoma cruzi* wird indirekt von blutsaugenden Raubwanzen übertragen. Die häufigsten Vektorarten sind *Triatoma infestans* /*dimidiata* und *Rhodnius prolixus* (Parker & Sethi, 2011) (**Abb. 2.9**). Nach der Blutmahlzeit hinterlassen die Raubwanzen nahe der Einstichstelle einen infektiösen Kothaufen. Durch Reiben und Kratzen

am Stich gelangen die Parasiten durch Hautrisse, über die Schleimhäute von Nase und Mund oder die Augen in den menschlichen Körper. Merkmale einer lokalen Infektion sind ein gerötetes Ödem (Chagom) (Lescure *et al.*, 2010) oder eine einseitige Schwellung beider Augenlider mit Konjunktivitis (Romana-Zeichen) (Hahn *et al.*, 2004). Weitere Übertragungsmöglichkeiten sind Bluttransfusionen und Organtransplantationen oder die kongenitale Übertragung von der Mutter auf das ungeborene Kind. Die Raubwanzen leben in Rissen und Spalten von Lehmhütten und deren Dächer in ärmlichen ländlichen Gegenden oder suburbanen Gebieten. Als Reservoir dienen neben Wildtieren wie Gürteltiere und Faultiere auch Haustiere wie Hund und Katze und Menschen, die asymptomatisch infiziert sind. Während die WHO 1981 noch von 20 Mio. Infizierten ausging, wird die Zahl 2009 auf 10 Mio. geschätzt. Jährlich sterben etwa 10.000 Menschen an der Chagaskrankheit (WHO, 2010).

Im Gegensatz zu afrikanischen Trypanosomen vermehren sich *T. cruzi* im Menschen intrazellulär in verschiedenen Zellen beispielsweise Makrophagen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen (Andrade & Andrews, 2005). Zunächst befinden sie sich in einer parasitophoren Vakuole, deren Ansäuerung sie verhindern. Dann gelangen sie in das Zytoplasma und wandeln sich von ihrer trypomastigoten Form (ca. 20 µm lange, begeißelte Form) in die amastigote Form (ca. 2-3 µm lang, unbegeißelt) um (Abb. 2.9). Sie vermehren sich durch



**Abb. 2.9:** Lebenszyklus von *T. cruzi*

a) Schematischer Lebenslauf: Nach einer Blutmahlzeit hinterlassen Raubwanzen nahe der Einstichstelle einen kleinen infektiösen Kothaufen. Durch Reiben und Kratzen am juckenden Stich gelangt *T. cruzi* in den Körper und invadieren in Zellen. Dort wandeln sie sich in die amastigote Form (2-3 µm, unbegeißelt) um und vermehren sich. In Form einer Pseudozytose können sie intrazellulär persistieren. Platzt die Zyste auf, wandeln sich die Parasiten in die trypomastigote Form (ca. 20 µm lange, begeißelt) um und verbreiten sich über den Blutstrom im Körper. Saugt eine Raubwanze erneut Blut, gelangt *T. cruzi* in den Verdauungstrakt. Im Mitteldarm entwickeln sich die trypomastigoten Trypanosomen (Geißel apikal, Zellkern zentral) zur epimastigoten Form (Geißel entspringt zentral, Zellkern apikal) und vermehren sich durch Zweiteilung. Im Enddarm entsteht schließlich die metazyklische trypomastigote Form, die mit dem Wanzenkot ausgeschieden wird. b) Raubwanze nach eine Blutmahlzeit (TDR Image 5360) c) Pseudozyste im Herzmuskelgewebe (TDR Image 5363). (WHO & TDR, 2011b)

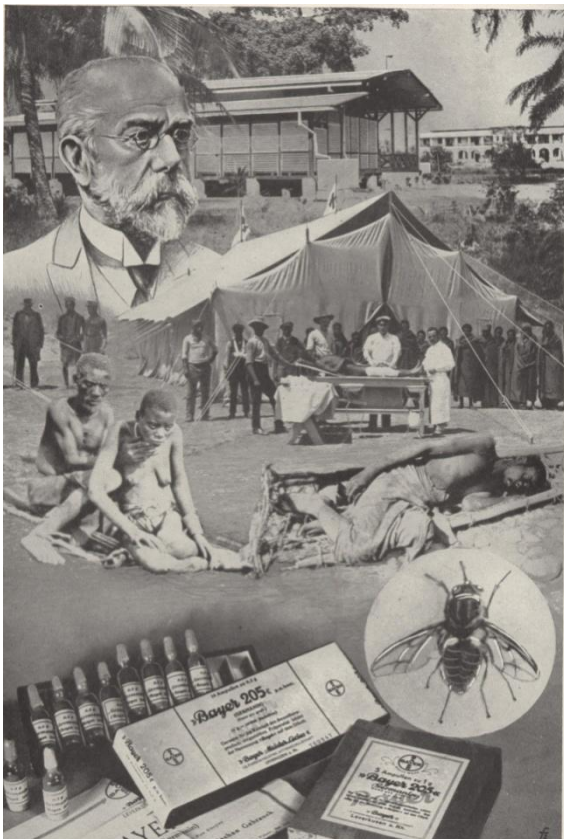
Zweiteilung bis die Zelle platzt und die Trypanosomen freigesetzt werden. Extrazellulär wandeln sie sich wieder in die trypomastigote Form um, breiten sich über den Blutstrom im Körper aus und infizieren neue Zellen. Intrazellulär können sie im Gewebe in Form von Pseudozysten persistieren (**Abb. 2.9c**). Bei einer Blutmahlzeit gelangen die trypomastigoten Trypanosomen (Geißel apikal, Zellkern zentral) in den Verdauungstrakt der Raubwanze. Im Mitteldarm entwickeln sie sich zur epimastigoten Form (Geißel entspringt zentral, Zellkern apikal) und vermehren sich im Enddarm durch Zweiteilung. Nach ihrer Umwandlung zu metazyklischen Trypomastigoten adhärieren sie mit ihrer Geißel an das Darmepithel und werden mit dem Kot ausgeschieden (Andrade & Andrews, 2005; Despommier *et al.*, 2005; Lang & Löscher, 2000; Morel & Lazdins, 2003; WHO & TDR, 2011b).

Die Chagaskrankheit manifestiert sich in einer akuten und sofern unbehandelt in einer darauffolgenden chronischen Phase. In der akuten Phase kommt es zu hohen Parasitämien mit Fieberschüben und anderen unspezifischen Symptomen. Besonders ernsthaft sind Infektionen bei Kindern unter zwei Jahren. Die chronische Phase hingegen kann einerseits lebenslang und asymptomatisch verlaufen, andererseits kann sie sich in der kardialen Form, in der gastrointestinalen Form oder in einer Mischung beider Formen ausprägen. Bei der kardialen Form wird besonders der Herzmuskel von den Parasiten befallen und es kommt u.a. zu starken Entzündungsreaktionen, Herzfehlern und Herzrhythmusstörungen, die zum Herzstillstand führen können. Bei der gastrointestinalen Form treten starke Organvergrößerungen besonders im Bereich des Ösophagus und des Kolons auf. Der Patient verstirbt meist an multiplen Organversagen. Zur Behandlung stehen Benznidazol und Nifurtimox zur Verfügung. In der akuten Phase können Patienten vollständig geheilt werden. In der chronischen Phase sinkt der Heilungserfolg mit der Dauer der Infektion. Besonders bei Patienten über 50 Jahre müssen die toxischen Nebenwirkungen mit den Chancen einer erfolgreichen Behandlung abgewogen werden (Hahn *et al.*, 2004; Parker & Sethi, 2011; WHO, 2010).

Da Impfstoffe nicht zur Verfügung stehen, sind zur Zeit die Vektorkontrolle durch Insektizide und Maßnahmen zu einer verbesserten Hygiene und Wohnungssituation die erfolgversprechendsten Präventionen (WHO, 2010).

### 2.2.3 DIE AFRIKANISCHE SCHLAFKRANKHEIT

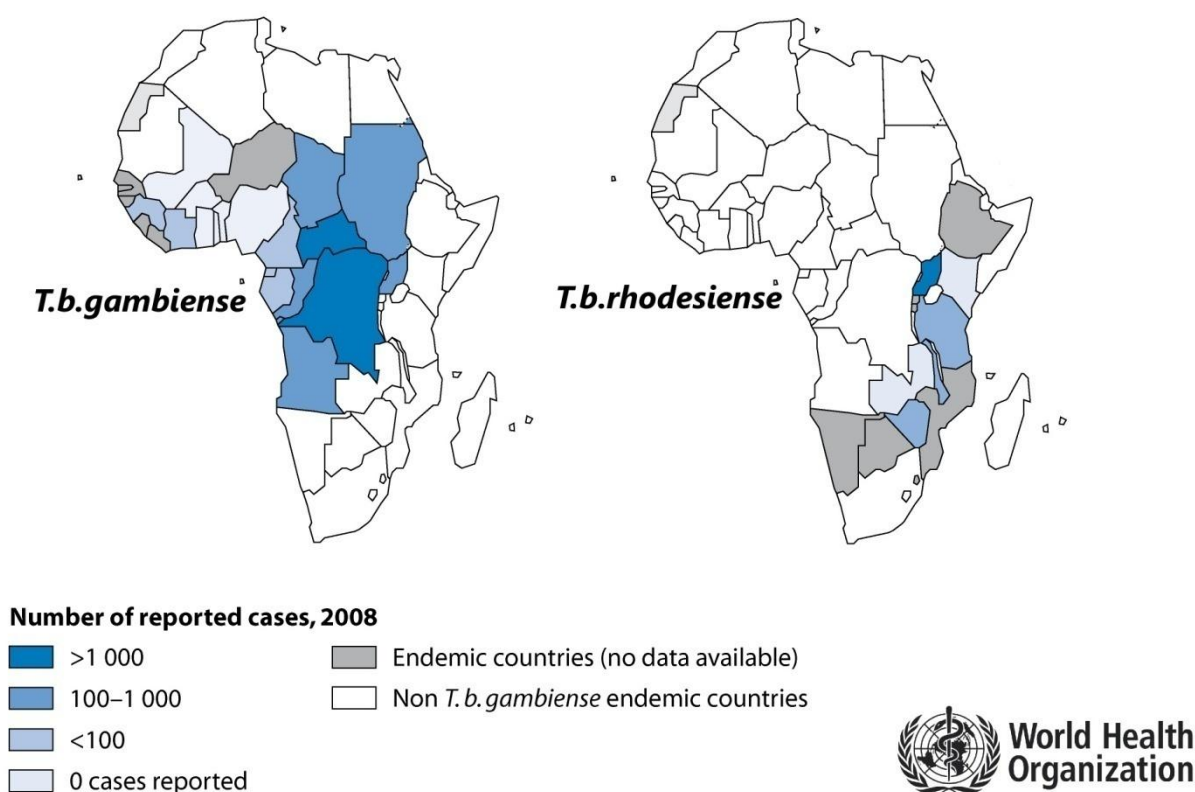
Seit dem 18. Jahrhundert ist die Afrikanische Schlafkrankheit (Human African Trypanosomiasis, HAT) in Europa bekannt (Atkins, 1742). Die erste genauere Beschreibung aber lieferte Dr. Winterbottom 1803 (Winterbottom, 1803), der eine „merkwürdige“ Seuche, deren Opfer in Lethargie verfielen, diagnostizierte. Ein nach ihm benanntes Symptom, das Winterbottom-Zeichen, ist eine Schwellung der Lymphdrüsen im Nackenbereich, das im Frühstadium der Infektion auftreten kann. Unter Sklavenhändlern war dieses Zeichen schon lange als Zeichen für besonders „faule“ Sklaven bekannt. Im 19. Jahrhundert werden Trypanosomen erstmals beobachtet und das Genus *Trypanosoma* wurde 1843 von David Gruby beschrieben (Raadt & WHO, 2005). Den Zusammenhang zwischen Trypanosomen, Tsetsefliegen und Säugetieren stellte Sir David Bruce her. Er identifizierte 1895 den Erreger der Rinderseuche Nagana, erkannte in den Tsetsefliegen den Vektor und beschrieb 1899 die Art *Trypanosoma brucei* (Bruce, 1895). Einige Jahre danach wurden die Erreger der HAT beschrieben. Die in Westafrika auftretende Variante wird von *Trypanosoma brucei gambiense*



**Abb. 2.10:** Kollage „Schlafkrankheitsbekämpfung durch deutsche Kolonialärzte“  
Dargestellt ist Robert Koch, ein idealisiertes Feldlazarett, Patienten, eine Tsetsefliege und das Medikament Bayer205 (heute: Suramin).  
Gemeinfreie Bilddatei (Kunze, 1938)

(Dutton, 1902) und die ostafrikanische Form wird von *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Stephens & Fantham, 1910) verursacht. Man geht heute davon aus, dass die Krankheit erst durch die Invasion der Europäer in Afrika epidemische Auswirkung annehmen konnte. Um die Ressourcen in den Kolonien ausbeuten zu können, wurden Straßen und Eisenbahnen gebaut und neue Gebiete im Einflussbereich der Tsetsefliege besiedelt. Über die neue Infrastruktur breitete sich die Krankheit aus und wurde zu einer Bedrohung für die Produktivität der Kolonien durch Verlust der Arbeitskräfte. 1904 informiert Robert Koch die deutsche Regierung über 50.000 bis 200.000 Tote in den deutschen „Schutzgebieten“. Deutschland und andere Kolonialmächte entsandten Expedition zur Erforschung und

Eindämmung der Schlafkrankheit nach Afrika. Während der deutschen Ostafrikaexpedition von 1906/7 experimentierte Robert Koch mit dem arsenhaltigen Atoxyl, das bei geringen Konzentrationen zu rezidivierenden Krankheitsverläufen und bei höheren Dosen bis zur Erblindung führte. Erst mit der Entdeckung von „Bayer205“ (Germanin, heute Suramin) im Jahre 1916 konnte die afrikanische Schlafkrankheit systematisch bekämpft werden (**Abb. 2.10**). Bis Mitte des 20. Jahrhunderts konnten die Kolonialmächte England und Frankreich durch systematische Bekämpfung die Inzidenz von 18 % auf unter 0,1 % der Bevölkerung senken. Mit der Unabhängigkeit der afrikanischen Länder wurden auch die Kontrollprogramme vernachlässigt und die Fallzahlen stiegen geschätzt auf 300.000-500.000 Infizierte gegen Ende des 20. Jahrhunderts (Grüntzig & Mehlhorn, 2009; Raadt & WHO, 2005; Steverding, 2008; WHO, 2010). Parallel dazu wurde die Produktion der einzigen Medikamente zur Behandlung des späten Krankheitsstadiums aus Kostengründen eingestellt (Eflornithin) oder sollten eingestellt werden (Melarsoprol). Kurze Zeit später kam Eflornithin als Bestandteil eines Präparates gegen Gesichtsbehaarung wieder auf den amerikanischen Markt. Durch darauffolgende Verhandlungen zwischen der WHO und den Pharmafirmen Sanofi-Aventis



**Abb. 2.11:** Fallzahlen registrierter Afrikanischer Schlafkrankheit für 2008.

Die westafrikanischen Schlafkrankheit wird ausgelöst von *T. b. gambiense* und die meisten Fälle wurden im Kongo und Zentralafrika registriert (links: dunkelblau). Die ostafrikanischen Schlafkrankheit wird von *T. b. rhodesiense* verursacht und am stärksten betroffen ist Uganda (rechts: dunkelblau). Die Gebiete der Erreger überlappen bisher nur in Uganda. Zusammengesetzt aus zwei Karten (WHO 2011)



und Bayer HealthCare ist die kostenlose Produktion aller fünf Medikamente gegen die afrikanische Schlafkrankheit bis 2011 sichergestellt (Barrett *et al.*, 2003). Entsprechend den Daten der WHO wurden die Fallzahlen für 2005 auf 50.000 bis 70.000 geschätzt. Die Fallzahlen für 2008 sind in **Abb. 2.11** geografisch dargestellt. Die Zahl der Neuerkrankungen fiel 2010 auf knapp 10.000 und damit auf den niedrigsten Stand seit 50 Jahren. Von *T. b. gambiense* werden davon ca. 95 % aller Infektionen verursacht.

Die zwei Formen der afrikanischen Schlafkrankheit werden von zwei unterschiedlichen Trypanosomenunterarten von ebenfalls unterschiedlichen Tsetsefliegenarten übertragen. Die westafrikanische Schlafkrankheit wird von *T. b. gambiense* ausgelöst und von der *Glossina palpalis*-Gruppe auf den Menschen übertragen. Die Palpalis-Tsetsefliegen kommen in feuchten Gebieten wie Wäldern und an Gewässern vor. Hingegen wird die ostafrikanische Schlafkrankheit von *T. b. rhodesiense* ausgelöst und von der *Glossina morsitans*-Gruppe übertragen. Diese Gruppe von Tsetsefliegen bevölkern die trockenen Savannengebiete Ostafrikas. Weibliche und männliche Tsetsefliegen ernähren sich ausschließlich von Blut. Man schätzt die Durchseuchung der Tsetsefliegenpopulation auf 0,1 % und infizierte Fliegen bleiben ihr Leben lang infektiös (Lang & Löscher, 2000). Auch bezüglich des Reservoirs gibt es Unterschiede: so gelten Menschen für *T. b. gambiense* als Hauptreservoir, während das Reservoir für *T. b. rhodesiense* hauptsächlich von Wildtieren und Rindern gebildet wird (Kennedy, 2008).

Die afrikanische Schlafkrankheit ist unbehandelt eine zu 100 % tödlich verlaufende Infektionserkrankung. Zwischen der west- und ostafrikanischen Variante der Krankheit gibt es allerdings Unterschiede bezüglich des Verlaufs und der Symptomatik (Tab. 2.2). Die Westafrikaform zeigt einen chronischen Verlauf und die Lebenserwartung beträgt ohne Behandlung etwa sechs Jahre. Die Ostafrikaform hingegen verläuft akut, die Krankheitsbilder zeigen sich innerhalb der ersten Tage und die Lebenserwartung ist unbehandelt selten länger als drei bis neun Monate. Bei beiden Formen unterscheidet man zwei Phasen. In der ersten hämolympathische Phase dringen die Parasiten in den Körper ein und vermehren sich im Blutstrom. Die Trypanosomen überwinden schließlich die BHS und infizieren das ZNS. Dies gilt als das Kriterium der zweiten meningoenzephalitischen Phase. Die erste Phase beginnt mit dem Eindringen der Trypanosomen in den Körper. An der Bissstelle kann sich eine schmerzhaft, ödematöse Schwellung, der Trypanosomenschanter, ausbilden (**Abb. 2.12**). Nach zwei bis vier Wochen kommt es zur systemischen Infektion mit zyklischem Auftreten

einer Parasitämie, die begleitet wird von Fieberschüben und Schüttelfrost. Diese Zyklen sind das Ergebnis der Oberflächenantigenvariation, mit deren Hilfe immer ein Teil der Trypanosomenpopulation dem Immunsystem entkommt. Neben der allgemeinen Unterdrückung des Immunsystems, die oftmals zu Sekundärinfektionen führt, sind weitere



**Abb. 2.12:** Trypanosomenschanke

An der Einstichstelle einer infizierten Tsetsefliege kann eine ödematöse Schwellung auftreten. Quelle: TDR Bild 9604382 (WHO/TDR)

mögliche Symptome ein Anschwellen der Lymphknoten im Nackenbereich (Winterbottom-Zeichen), Juckreiz, Kopf-, Muskel- und Gliederschmerzen sowie Ödeme (im Gesicht) und Hautreizungen. Während eine *Gambiense*-Infektion innerhalb der ersten Phase sogar nahezu asymptomatisch verlaufen kann, nimmt eine *Rhodesiense*-Infektion einen akuten Verlauf, da das Herz und die serösen Häute (Auskleidung der Brust- und Bauchhöhle, Herzbeutel) massiv befallen werden. Noch

bevor sich das zweite Stadium manifestieren kann, stirbt der Patient in vielen Fällen an einer akuten Myokarditis mit Herzversagen. Überwinden die Trypanosomen die BHS, manifestiert sich das zweite Stadium mit seiner charakteristischen Symptomatik, die der Krankheit ihren Namen gab. Die Infektion des ZNS tritt bei *Gambiense*-Infektionen nach vier bis sechs Monaten auf. Bei *Rhodesiense*-Infektionen ist das innerhalb weniger Wochen nach der Infektion schon der Fall. Die zweite Phase der Krankheit ist gekennzeichnet durch Schlafstörungen und der Aufhebung des zirkadianen Rhythmus. Es kommt zu Verhaltens- und Persönlichkeitsstörungen, Reizbarkeit, schneller Ermüdung und zunehmender Lethargie. Letztendlich folgt völlige Apathie mit zunehmender Somnolenz und der Fall ins Koma. Dieser Zustand kann sich bis zum Tod über mehrere Monate hinziehen (Hahn *et al.*, 2004; Kennedy, 2008; Lang & Löscher, 2000; Stich & Steverding, 2002). Eine Übersicht über beide Formen der Afrikanischen Schlafkrankheit bietet Tab. 2.2. Die Probleme bei der Behandlung sind zum einen das sog. „Staging“, also die Untersuchung in welcher Phase sich der Patient befindet und zum anderen die zur Verfügung stehenden Medikamente. Die verfügbaren Medikamente sind aufwendig in der Verabreichung und haben zahlreiche Nebenwirkungen (Barrett *et al.*, 2003; Dumas & Bouteille, 2000; Legros *et al.*, 2002).

**Tab. 2.2: Unterschiede zwischen west- und ostafrikanischer Schlafkrankheit**

	<b>Westafrikanische Form</b>	<b>Ostafrikanische Form</b>
Erreger	<i>T. brucei gambiense</i>	<i>T. brucei rhodesiense</i>
Parasitenreservoir	<u>Mensch</u> , Hausschwein, Hund	Antilopen, Rinder
Vektorgruppe (Glossina)	<i>Palpalis</i> -Gruppe (Feuchte Wald-/ Flussgebiete)	<i>Morsitans</i> -Gruppe (Savannen)
Virulenz	Moderat, regional variabel	Hoch
Trypanosomenschanke	Afrikaner < 5 % Europäer ~ 20 %	~ 50 %
Parasitämie	Niedrig, periodisch	Meist hoch, anhaltend
Klinischer Verlauf	Chronisch	Akut
ZNS Invasion	4-6 Monate nach der Infektion	Wenige Wochen nach der Infektion
Krankheitsdauer (unbehandelt)	Monate bis 6 Jahre	Wochen bis 9 Monate
Dominierender Organbefall	Zentrales Nervensystem	Herz und seröse Häute
Typische Todesursache	Chronische diffuse Meningoenzephalitis	Myo- und Pankarditis, Polyserositis
Behandlung Stadium 1*	Pentamidin	Suramin
Behandlung Stadium 2*	Melarsoprol, Eflornithin, Kombination mit Nifurtimox	Melarsoprol

Zusammenstellung aus (Lang & Löscher, 2000; Stich & Steverding, 2002) \*= nach (WHO, 2010)

Besonders folgenschwere Nebenwirkungen hat Melarsoprol, das eine Arsenkomponente enthält. Es führt in 10 % der Fälle zu einer reaktiven Enzephalopathie, an welcher die Hälfte verstirbt (Grab & Kennedy, 2008). Weiterhin sinkt der Therapieerfolg durch eine steigende Melarsoprolresistenz, die regional bereits in bis zu 30 % der Fälle auftreten kann (Brun *et al.*, 2001). Vor diesem Hintergrund ist eine sichere Diagnose lebensrettend. Der Nachweis der Infektion erfolgt über die mikroskopische Analyse von Blutaussstrichen oder über einen Antikörper vermittelten Schnelltest (CATT: card agglutination trypanosomiasis test) (Vanhollebeke *et al.*, 2006). Dieser Test eignet sich jedoch nicht für die Nachsorgeuntersuchung, die im Intervall von sechs Monaten für die Dauer von zwei Jahren erfolgen sollte (Lejon *et al.*, 2010). Wird der Befall mit Trypanosomen im Blut nachgewiesen,



erfolgt in der Regel eine Lumbalpunktion, bei der aus dem Rückenmark Zerebrospinalflüssigkeit entnommen wird. Können darin keine Trypanosomen nachgewiesen werden, gibt es weitere kontrovers diskutierte Indizien wie die Anzahl der Leukozyten oder den Gehalt von Protein und IgM-Antikörpern, die eine ZNS-Infektion indizieren (Kennedy, 2008). Da in naher Zukunft keine neuen Medikamente auf den Markt kommen werden (Richardson *et al.*, 1988), verbleibt für die Eindämmung der afrikanischen Schlafkrankheit die Verbesserung der Therapie, beispielsweise durch die Etablierung einer Kombinationstherapie von Melarsoprol, Elformithin und Nifurtimox (Kroubi *et al.*, 2011; Priotto *et al.*, 2006) und die Vektorkontrolle. Hierfür werden Moskitonetze für Tier und Mensch sowie Fliegenfallen mit dem kombinierten und gezielten Einsatz von Insektiziden verwendet (Kagbadouno *et al.*, 2011). Äthiopien setzt bei der Fliegenbekämpfung auf Gammastrahlen-sterilisierte Fliegenmännchen. Diese werden in Massen freigesetzt und sollen den Fortpflanzungserfolg der Art minimieren (Enserink, 2007).

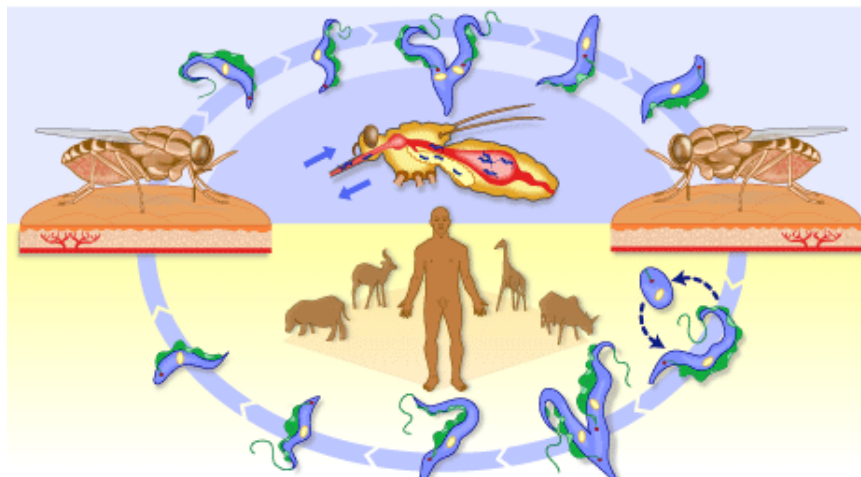
#### **2.2.4 BIOLOGIE UND PATHOGENITÄT VON *T. BRUCEI* SSP.**

*Trypanosoma brucei* durchläuft einen komplexen Lebenszyklus zwischen Säugetieren und Tsetsefliegen. Die Trypanosomen durchlaufen verschiedene Stadien und können sich gut an ihren Wirt und Vektor anpassen. Obwohl *T. b. gambiense* evolutionsbiologisch gesehen jünger ist, gilt diese Unterart als besser an den Menschen adaptiert als *T. b. rhodesiense* (Brun & Balmer, 2006). Der chronische Krankheitsverlauf der westafrikanischen Schlafkrankheit lässt den Wirt länger leben und die Parasiten haben eine höhere Chance über Tsetsefliegen weiter verbreitet zu werden.

Bei dem Stich einer Tsetsefliege werden circa 20.000 Trypanosomen übertragen (Stich & Steverding, 2002) (**Abb. 2.13**). Diese metazyklischen Trypomastigoten sind bereits an den Wirt angepasst und können sich lokal im Gewebe vermehren. Erreichen die Parasiten den Blutstrom, wandeln sie sich in lange, schlanke Blutformen um und vermehren sich im Gegensatz zu *T. cruzi* extrazellulär durch Längsteilung. Die Trypanosomen sind in der Lage das Endothel des Blutgefäßsystems zu überwinden und andere Organe zu besiedeln. Transmigrieren sie über die BHS in das ZNS, führt dies letztendlich zum Tod ihres Wirts. Ab einer bestimmten Zelldichte entwickeln sich einige Trypanosomen im Blutstrom zur amastigoten Form. Sie haben ein kurzes, gedrungenes Aussehen und sind teillungsaktiv. Aus dieser Form können sich die Parasiten nach einer Blutmahlzeit ihres Vektors im

Mitteldarm zu teilungsaktiven, prozyklischen Trypomastigoten (Geißelursprung apikal, Zellkern zentral) entwickeln. Über den vorderen Teil des Darmes wandern die Trypanosomen in die Speicheldrüsen ein und wandeln sich in epimastigote Formen (Geißelursprung zentral, Zellkern apikal) um und sind weiterhin teilungsaktiv. Diese Form kann mit ihrer Flagelle an das Epithel der Speicheldrüse adhären. In den Speicheldrüsen oder auf dem Weg dorthin kann es zu dem Trypanosomen-„Mating“, dem Verschmelzen von „+“ und „-“ Trypanosomen und zur Meiose kommen. Detaillierte Erkenntnisse über diese Prozesse liegen derzeit nicht vor (Gibson & Bailey, 1994; Gibson *et al.*, 2008). Aus den epimastigoten Formen entstehen schließlich teilungsinaktive metazyklische Trypomastigote, die bei einer Blutmahlzeit auf einen Wirbeltierwirt übertragen werden (Despommier *et al.*, 2005; The-Wellcome-Trust *et al.*, 2005; WHO & TDR, 2011a) (**Abb. 2.13**).

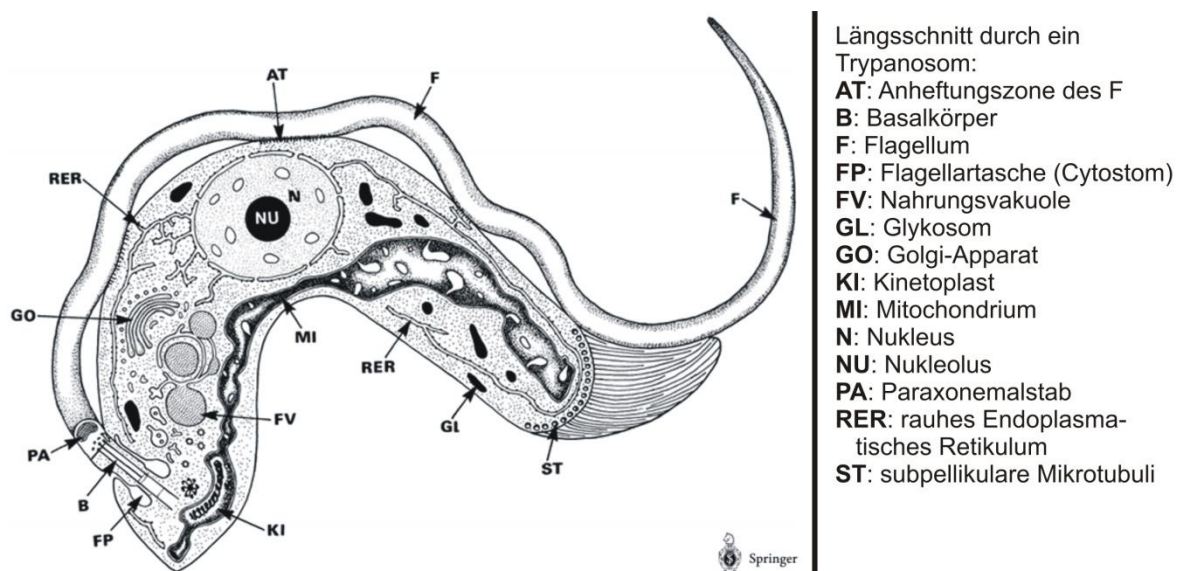
Die trypomastigoten Blutformen sind in vielfältiger Weise an ihren Wirt angepasst. Diese Anpassungen umfassen den Energiestoffwechsel, die Ausbildung eines bestimmten Zellmantels, die Manipulation des Immunsystems sowie die Expression verschiedener Virulenzfaktoren zur Überwindung von Gewebearrieren. Während die Trypanosomen in der Tsetsefliege ihre Energie aus dem Katabolismus von Aminosäuren beziehen, gewinnen sie in der Blutbahn ihrer Energie hauptsächlich mit Hilfe der Glykolyse. In einem speziellen



**Abb. 2.13:** Lebenszyklus von *T. brucei* ssp.

Schematische Darstellung des Lebenszyklus mit Schwerpunkt auf dem Wirtswechsel. Bei der Blutmahlzeit einer Tsetsefliege werden die Trypanosomen auf den Menschen übertragen. Von der Einstichstelle aus gelangen sie in die Blutbahn. Dort vermehren sie sich durch Längsteilung als lange, schlanke, auch trypomastigot genannte Blutformen. Sie verbreiten sich über den Blutstrom und können andere Organe befallen, beispielsweise überwinden sie die BHS und infizieren das Gehirn. Ein kleiner Teil der Population verwandelt sich in die amastigote Form, die klein, gedrungen und vermehrungsunfähig ist. Saugt eine Tsetsefliege Blut, gelangen die Trypanosomen in den Darm der Fliege. Dort entstehen aus den amastigoten Formen asexuell vermehrungsfähige prozyklische Formen. Diese wandern in die Speicheldrüse ein und wandeln sich zu epimastigoten Formen um. Aus den epimastigoten Trypanosomen werden schließlich metazyklische trypomastigote Formen, die sich nicht mehr teilen können und bereit für den Wirtswechsel sind. Quelle: (WHO & TDR, 2011a)

Kompartiment der Kinetoplastida, dem Glykosom, werden die ersten Schritte der Glykolyse von der Glukose bis zu 3-Phosphoglycerat (3PG) katalysiert. 3PG wird im Zytoplasma zu Pyruvat umgewandelt und kann entweder sezerniert oder im Mitochondrium zu Acetyl-CoenzymA (AcetylCoA) abgebaut werden. AcetylCoA kann für die Synthese von Succinat im reversen Citratzyklus oder für die Lipidbiosynthese im Zytosol verwendet werden. Unter ATP-Gewinn kann AcetylCoA auch zu Acetat oxidiert werden. Reduktionsäquivalente (NADH) aus katabolen Prozessen werden in einer ubiquinonhaltigen Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran oxidiert. Dabei wird  $O_2$  über eine alternative Oxidase zu  $H_2O$  reduziert. Die Expression von Cytochromen und einer membranständigen ATP-Synthase erfolgt nur unter Glukosemangel (Berriman *et al.*, 2005; Bringaud *et al.*, 2006).

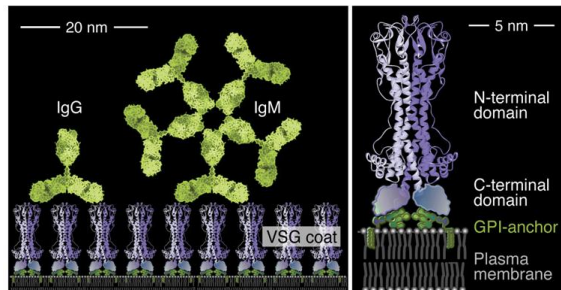


**Abb. 2.14:** Schematische Darstellung eines Trypanosoms.

Das einzige Mitochondrium (**MI**) durchspannt die gesamte Zelle und weist in der Nähe des Basalkörpers (**B**) einen Bereich ohne Kristae auf. Diese Region wird als Kinetoplast (**KI**) bezeichnet und enthält DNA. In den Glykosomen (**GL**) laufen die ersten sieben Schritte der Glykolyse ab. Unterhalb der Zytoplasmamembran verlaufen die subpellikularen Mikrotubuli (**ST**), die nur im Bereich der Flagellartaschen (**FP**) ausgespart sind. Diese Taschen dienen der pinozytotischen Nahrungsaufnahme. In diesem Bereich entspringt die Flagelle (**F**), die sich am ganzen Körper entlang zieht und teilweise an der Zellohülle verankert (**AT**) ist. In Schwimmrichtung vorne hängt die Flagelle etwas über. (Mehlhorn, 2004)

Die Hülle der Trypanosomen ist komplex und wird als Pellicula bezeichnet. Sie besteht aus einer Plasmamembran mit darunter liegenden Mikrotubuli, die entlang der Längsachse schraubig angeordnet sind (**Abb. 2.14**). Im Bereich der Flagellartasche fehlen die Mikrotubuli, hier findet die Nahrungsaufnahme mittels Pinozytose statt (Zytostom). Außerhalb der Zytoplasmamembran befindet sich eine 15 nm dicke Hülle aus einem einzigen Glykoprotein (VSG, variant surface protein), das in  $10^7$  Kopien vorliegt und über einen GPI-Anker (Glykosyl-

Phosphatidyl-Inositol) in der Plasmamembran verankert ist (**Abb. 2.15**). Das VSG-Glykoprotein verdeckt alle anderen Oberflächenproteine und verhindert so deren Reaktion mit den Antikörpern des Wirtes. Zwar werden Antikörper gegen das VSG gebildet, doch durch die Expression einer VSG Variante entkommen die Trypanosomen den Antikörpern. Im Genom finden sich 806 verschiedene VSG Gene (Berriman *et al.*, 2005). Die Gene liegen geclustert im Subtelomerbereich. Es wird stets nur ein VSG-Gen von der RNA-Polymerase I transkribiert. Die Expression eines anderen VSG-Gens geschieht durch Mechanismen, die ein Rekombinationsereignis benötigen, wie duplikative Transposition (Genkonversion) und Telomeraustausch oder durch Wechsel des

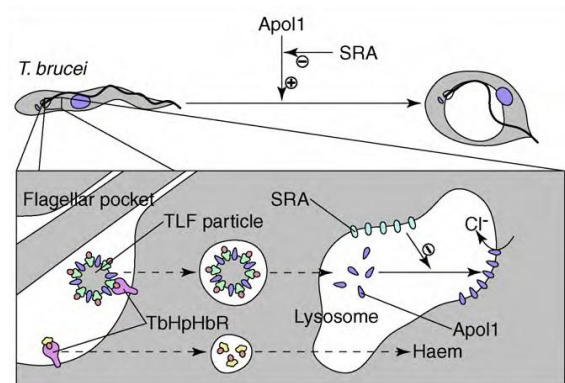


**Abb. 2.15:** VSG Mantel von Trypanosomen.

Die Moleküle des Variant Surface Glycoprotein (VSG) sind C-terminal über einen GPI (Glykosylphosphatidylinositolrest) in der Membran verankert und bilden eine homogene Oberfläche. (Engstler *et al.*, 2007)

aktiven Promotors (Schwede & Carrington, 2010). Durch Veränderung des VSG-Mantels gelingt es den Trypanosomen dem Immunsystem zu entkommen und hohe Parasitiämiewellen zu verursachen. Das Immunsystem bildet neue Antikörper gegen das neue VSG und reduziert die Trypanosomenzahl im Blut wieder (Stich & Steverding, 2002). Einen weiteren Schutzmechanismus der Parasiten haben Engstler und Kollegen beschrieben: Da Trypanosomen stets gegen den Blutstrom schwimmen, haben gebundene Antikörper einen relativ hohen Strömungswiderstand auf der homogenen VSG-Hülle, so dass sie im hinteren Bereich des Trypanosoms angereichert werden. Dort befindet sich die Flagellartasche und durch ständige Pinocytose werden die gebundenen Antikörper aufgenommen und abgebaut. Die „sauberen“ VSG-Moleküle kehren an die Oberfläche zurück. Durch den Knockdown der mittleren Dyneinkette konnten die Trypanosomen nur noch rückwärts schwimmen und waren nicht mehr vor antikörperinduzierter Komplementlyse geschützt (Engstler *et al.*, 2007). Schließlich gewinnen die Trypanosomen die Oberhand durch die Erschöpfung des Wirtes aufgrund von Glukosemangel und Anreicherung von Stoffwechselabfällen der Trypanosomen im Blut (Despommier *et al.*, 2005). Im Magendarmtrakt des Vektors wird der VSG-Mantel mit Hilfe einer membranverankerten Zink-Metalloprotease (MSP B) entfernt (Grandgenett *et al.*, 2007). An seine Stelle tritt ein Mantel aus Procyclin-Proteinen (PARP= procyclic acidic repetitive protein) (Richardson *et al.*, 1988), deren genaue Funktion *in vivo* noch ungeklärt ist (Vassella *et al.*, 2001).

Essentiell für das Überleben im menschlichen Körper ist die Resistenz gegen die trypanolytischen Faktoren (TLF) des Serums (**Abb. 2.16**). Die zwei Serumkomplexe TLF1 und TLF2, zum einen eine Subfaktion der HDLs (HDL<sub>3</sub>; Heavy density lipoprotein) und zum anderen ein Komplex aus IgM /ApoL A1 (Apolipoprotein) vermitteln über die Proteine ApoL1 und Hpr (Haptoglobin-related) die trypanozide Aktivität (Vanhollebeke & Pays, 2010; Wheeler, 2010). Die Aufnahme erfolgt über rezeptorvermittelte Endozytose. *T. brucei* ist für Häm auxotroph und ist darauf angewiesen, über den TbHpHb-Rezeptor an Haptoglobin (Hp) gebundenes Hämoglobin (Hb) aus dem Serum aufzunehmen. TLF1 enthält „haptoglobin related“ (Hpr), welches ebenfalls Hb bindet und ebenso von TbHpHbR gebunden und aufgenommen wird (Vanhollebeke *et al.*, 2008). Im Lysosom verändert ApoL1 seine Konformation und bildet eine für Cl<sup>-</sup> und andere Anionen durchgängige Pore (Pays *et al.*, 2006; Vanhamme *et al.*, 2003). Nachströmendes Wasser lässt das Lysosom immer weiter anschwellen und schließlich platzen, was zum Zelltod des Trypanosoms führt (Vanhollebeke *et al.*, 2007). Einzig



**Abb. 2.16: Trypanolytischer Faktor (TLF)**

TLF bindet über Hpr (Haptoglobin related; grün) an den TbHpHb Rezeptor (rosa) und gelangt ins Lysosom. ApoL1 (lila) bildet Cl<sup>-</sup>-Poren in der Membran. H<sub>2</sub>O strömt nach, das Lysosom schwillt an und platzt, was zum Zelltod führt. *T. b. rhodesiense* exprimiert das SRA Protein, was ApoL1 im Endosom bindet und dessen porenbildende Aktivität verhindert. Die primäre Aufgabe von TbHpHbR ist die Aufnahme von Hämoglobin (Hb; rot), was im Blut an Haptoglobin (Hp; gelb) gebunden ist. (Wheeler, 2010)

Durch die Expression von SRA (serum resistance associated), ein verkürztes VSG-Molekül (De Greef & Hamers, 1994), wird die TFL-Resistenz induziert. SRA lokalisiert im endosomalen Kompartiment und bindet ApoL1. Durch diese Bindung wird die porenbildende Aktivität von ApoL1 im Lysosom verhindert (Oli *et al.*, 2006). Der TFL2-Mechanismus wurde noch nicht aufgeklärt und es fehlen Nachweise für die *in vivo* Aktivität (Vanhollebeke & Pays, 2010).

Die humanpathogenen Trypanosomen manipulieren auf komplexe Weise das Immunsystem und die involvierten Mechanismen sind nur wenig aufgeklärt. Als Reaktion auf die lokale Infektion an der Bissstelle werden Makrophagen und Dendritische Zellen über GPI-Reste

freigesetzter VSG-Moleküle aktiviert, trypanozide Moleküle, wie TNF- $\alpha$  (Daulouede *et al.*, 2001) und ROI (reactive oxigen intermediates), werden freigesetzt und begrenzen die Infektion zunächst (Mansfield & Paulnock, 2005). Die systemische Ausbreitung der Trypanosomen bekämpft der Körper mit einer massiven B-Zellantwort im Blutstrom und einer VSG-spezifischen T<sub>H</sub>1 (T-Helferzellen) Antwort im Gewebe (Dagenais *et al.*, 2009). Die Antikörper der B-Zellen führen zwar zur Neutralisierung der meisten Trypanosomen, doch ein kleiner Teil mit einem veränderten VSG-Mantel überlebt und kann sich vermehren (Mansfield & Paulnock, 2005). Im Mausmodell zeigte sich, dass gerade die B-Zellantwort zur Selektion auf hoch virulente Tochterzellpopulationen führt, auch wenn die Trypanosomenpopulation bei der Erstinfektion kaum virulent waren. Diese intraklonale Virulenzsteigerung ist unabhängig von der Art des VSG-Mantels (Dagenais *et al.*, 2009; Inverso *et al.*, 2010). Paulnock und Kollegen gehen daher davon aus, dass die wichtigste Komponente zur Trypanosomen-bekämpfung die T<sub>H</sub>1 vermittelte Makrophagenaktivierung durch die Freisetzung von IFN $\gamma$  ist. Allerdings ist der Körper nicht in der Lage, die Antwort aufrecht zu erhalten und die IFN $\gamma$  Produktion wird durch den Einfluss von IFN $\alpha/\beta$  (Lopez *et al.*, 2008) und anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 reduziert (Mansfield & Paulnock, 2005). Weiterhin zeigte sich *in vitro*, dass IFN $\gamma$  das Wachstum von Trypanosomen stimuliert (Mansfield & Paulnock, 2005; Vincendeau & Bouteille, 2006) und die Transmigration über die BHS fördert (Masocha *et al.*, 2004). Letztendlich versagen sämtliche Resistenz- und Abwehrmechanismen des Körpers, was zu einem unkontrollierten Wachstum der Trypanosomen und schließlich immer zum Tod des Menschen führt.

## 2.3 STREPTOKOKKEN

Streptokokken gehören zu den Lactobacillales, den Milchsäurebakterien (Garrrity, 2004). Sie sind rundliche, gram-positive, unbegeißelte und Katalase-negative Bakterien. Sie treten als Diplokokken wie *S. pneumoniae* oder in Ketten wie *S. agalactiae* auf und bilden keine Sporen (Patterson *et al.*, 1992). Streptokokken sind aerotolerante Anaerobier und verwerten für ihren Energiestoffwechsel ausschließlich Zucker homofermentativ. Sie sind darauf angewiesen verschiedene Nährstoffe wie bestimmte Aminosäuren, Vitamine, Purine und Pyrimidine aus der Umgebung aufzunehmen (Madigan & Martinko, 2009). Bevorzugt werden sie auf Blutagar kultiviert und können auf diesem, entsprechend ihres Vermögens Erythrozyten zu lysieren und Hämoglobin abzubauen, charakterisiert werden (Shottmuller, 1903). Bei der sogenannten Hämolyse unterscheidet man die  $\beta$ -Hämolyse, eine Zelllyse mit dem vollständigen Abbau des Hämoglobins, von der unvollständigen, vergrünenden  $\alpha$ -Hämolyse. Kokken, die keine hämolytische Aktivität aufweisen, werden als  $\gamma$ -hämolytisch klassifiziert. Die serologische Einteilung erfolgt anhand von Oberflächenantigenen der Zellwand und der Kapsel. Eine vor allem in der klinischen Praxis verwandte Einteilung ist die Klassifizierung nach Lancefield (Lancefield, 1933), die jedoch nicht artspezifisch ist und auf Antikörperreaktionen gegen Oberflächenbestandteile beruht. Besonders für die Gruppe der nicht- $\beta$ -hämolytischen Streptokokken sind molekularbiologische Methoden für eine genaue Bestimmung notwendig (Facklam, 2002). Streptokokken kommen in der Normalflora des Menschen und von Tieren vor. Einigen Arten haben das Potential beim Menschen eine Meningitis auszulösen. Diese sind in Tab. 2.3 gesondert gekennzeichnet.

**Tab. 2.3: Lancefield Klassifikation von Streptokokken**

Gruppe	Art	Meningitis-Potential
A	<i>S. pyogenes</i>	+
B	<i>S. agalactiae</i>	+
C	<i>S. equi, zooepidemicus, galactiae, pyogenes, haemolyticus</i> <i>S. equisimilis</i>	+
D	<i>S. faecalis, durans, liquefaciens, bovis</i>	
E	<i>S. uberis, infrequens</i>	
F	<i>S. minutus</i>	
G	<i>S. anginosus</i>	

Gruppe	Art	Meningitis-Potential
H	<i>S. sanguis, dysgalactiae</i>	
N	<i>S. lactis, cremoris</i>	
R	<i>S. suis</i>	+
K-M;O-Q;S	nicht näher bezeichnet	
n.b.	<i>S. pneumoniae</i> (keine Einordnung)	+

**n.b.**= nicht bestimmbar; Verändert nach: Roche Medizinlexikon (Roche, 2003) und (Hahn *et al.*, 2004; Patterson *et al.*, 1992)

### 2.3.1 KOMMENSALEN UND KRANKHEITSERREGER

Streptokokken besiedeln als Kommensalen und opportunistische Krankheitserreger zahlreiche Oberflächen des menschlichen Körpers. Sie können zwischen Mensch und Tier übertragen werden, vor allem wenn Mensch und Tier in engen Kontakt zueinander leben wie im Fall von Haus- und Nutztieren. Lösen Streptokokken Krankheiten aus, verursachen sie meist Hautinfektionen sowie Infektionen des Respirationstraktes und des Blutstroms (Patterson *et al.*, 1992). Streptokokken sind eine große und vielfältige Gruppe. So zeigte sich bei einem Genomvergleich von *S. mutans*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae* und *S. pneumoniae* Stämmen, dass diese Gruppe zwar über ein gemeinsames Kerngenom verfügt, jedoch nicht über einen gemeinsamen Pool an Virulenzgenen (Mitchell, 2003).

Zu den medizinisch relevanten  $\beta$ -hämolytischen Streptokokken gehören im besonderen *S. pyogenes* (GAS= Gruppe A Streptokokken) und *S. agalactiae* (GBS= Gruppe B Streptokokken). GAS können eitrige Lokalinfektionen (Angina, Pharyngitis, Pyodermien) und schwerwiegende invasive Erkrankungen wie Scharlach, Sepsis, STLS (Streptokokken-Toxic-Shock-Like-Syndrom) und nekrotisierende Faszitis auslösen. Weiterhin spielen sie eine Rolle bei immunpathologisch bedingten Folgeerkrankungen wie akutes rheumatisches Fieber oder akute Glomerulonephritis (Hahn *et al.*, 2004). Für die Behandlung von GAS-Infektionen werden hauptsächlich  $\beta$ -Lactamantibiotika eingesetzt, gegen die *S. pyogenes* im Gegensatz zu Makroliden, wie Clindamycin, und Tetrazyklinen noch keine Resistenzen akkumuliert hat (Bessen, 2009).

Gruppe B Streptokokken kommen hauptsächlich bei Tieren vor. Unter Tiermedizinerinnen sind sie als Verursacher des gelben Galts bekannt, einer eitrigen Entzündung des Kuheuters, die zum Versiegen der Milchproduktion führt (Brandis *et al.*, 1994). Beim Menschen besiedeln GBS



den Gastrointestinal- und den Geschlechtstrakt. *S. agalactiae* ist in der Lage systemische Infektionen bei immunkompromittierten Erwachsenen auszulösen. Von größerer Bedeutung sind allerdings lebensbedrohliche Infektionen von Neugeborenen, die oftmals tödlich enden. Bei der Geburt von der Mutter auf das Kind übertragen, kann sich eine GBS-Infektion in den ersten postnatalen Stunden bis sieben Tagen (early onset disease, EOD) als Lungenentzündung andeuten und sich schnell zu einer invasiven Erkrankung mit Bakteriämie und STLS entwickeln. Infektionen mit GBS in den Tagen 7 bis 90 nach der Geburt werden als „late onset disease“ (LOD) bezeichnet. Als Risikofaktoren für eine Neugeboreneninfektion gelten ein vorzeitiger Blasensprung, Frühgeburt, aufsteigende Infektionen (Chorioamnionitis) und Zervixinsuffizienz (Hahn *et al.*, 2004). Invasive Streptokokken vermehren sich im Blutstrom und können die Blut-Hirnschranke überwinden, was zu einer Meningitis führt (Rajagopal, 2009). Trotz Antibiotikabehandlung ist die Mortalität hoch und Überlebende leiden oftmals unter neurologischen Schäden (Doran *et al.*, 2003). Als beste Prävention vor EOD wird die intravenöse *intra partum* Chemoprophylaxe angesehen. Vier Stunden vor Geburt wird GBS-positiven Schwangeren ein  $\beta$ -Lactamantibiotikum (Penicillin, Ampicillin) verabreicht (Verani *et al.*, 2010). Diese Maßnahme verringert jedoch nicht die Wahrscheinlichkeit für LOD. Einen Impfstoff gegen GBS gibt es derzeit nicht. Im Allgemeinen sind *S. agalactiae*-Infektionen mit Penicillin behandelbar. Berichte über Resistenzentwicklungen liegen zurzeit nur für Erythromycin und Clindamycin vor (Koenig & Keenan, 2009).

In seltenen Fällen können Gruppe C Streptokokken (GCS), die als opportunistische Pathogene bei domestizierten Tieren bekannt sind, invasive Erkrankungen beim Menschen auslösen. Ein Beispiel für Gruppe C Streptokokken ist *S. equi* ssp. *zooepidemicus*, welcher nicht in der humanen Normalflora vorkommt. Er ist als virulenteste Art seiner Gruppe dafür bekannt, dass er von Pferden auf Menschen übertragen werden und Bakteriämie und Meningitis auslösen kann. Derartige Infektionen können i.d.R mit Penicillin behandelt werden (Eyre *et al.*, 2010; Minces *et al.*, 2011; Rajasekhar & Clancy, 2010).

Andere Streptokokkenarten besiedeln als Bestandteil der Normalflora beispielsweise die Mundhöhle sowie den Nasenrachenraum. Im Mundraum leben Arten wie *S. mutans* (Verursacher von Zahnbelag) oder *S. salivarius* (Auslöser von Karies). Im Nasopharynx finden sich neben avirulenten Arten wie *S. oralis* und *S. mitis* bei 20-40 % der Kinder und 5-10 % der Erwachsenen auch *S. pneumoniae* (SPN; Pneumokokken) (Kayser *et al.*, 2005). In dieser Nische

konkurrieren sie mit Arten wie *Haemophilus influenza* oder *Moraxella catarrhalis* (Henriques-Normark *et al.*, 2008). Auf die Rolle der Pneumokokken als Krankheitserreger wird im nachfolgenden Abschnitt gesondert eingegangen.

### 2.3.2 *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Pneumokokken oder *S. pneumoniae* sind  $\alpha$ -hämolytische Diplokokken. Unter aeroben Bedingungen sezernierte Stoffwechselprodukte, hauptsächlich  $H_2O_2$ , oxidieren das Hämoglobin der Erythrozyten zu Methämoglobin, welches schließlich zu grünlichem Sulfhämoglobin umgewandelt wird. Als einzige Streptokokkenspezies sind Pneumokokken sensitiv für Optochin. Antigengruppen nach Lancefield können für die Pneumokokken nicht bestimmt werden, daher unterscheidet man die bislang bekannten 91 Serotypen nach der Neufeld'schen Quellung als Reaktion auf kapselantigenspezifische Antiseren (Neufeld, 1902). Bekapselte Stämme zeigen eine glatte und glänzende Kolonieoberfläche, den sogenannte S-Phänotyp („smooth“). Im Gegensatz dazu haben unbekapselte Stämme eine raue Kolonieoberfläche und werden als R-Phänotyp („rough“) beschrieben. 1928 entdeckte Frederick Griffith, dass lebende avirulente R-Stämme in der Lage waren, die genetische Information für die Kapsel von toten virulenten S-Stämmen aufzunehmen und zu exprimieren. Diesen Prozess nannte er Transformation (Griffith, 1928). Oswald Avery konnte 16 Jahre später die DNA als transformierendes Agens definieren (Avery *et al.*, 1944). Dass diese Entdeckungen an Pneumokokken erfolgten, liegt auch darin begründet, dass sie als natürlich kompetent gelten. Das Stadium der Kompetenz ist nicht konstitutiv, wird jedoch durch Quorum sensing Moleküle in einer bestimmten Wachstumsphase aktiviert (Tomasz & Hotchkiss, 1964). Die kompetenzstimulierenden Peptide 1 und 2 (Competence Stimulating Peptide, CSP) (Pozzi *et al.*, 1996) werden sezerniert und von anderen Pneumokokken über das Zweikomponentensystem ComDE wahrgenommen. Als Folge der CPS-induzierten Signaltransduktion werden 17 Gene („early genes“) exprimiert, darunter der alternative Sigmafaktor  $\sigma^x$ , unter dessen regulatorischer Kontrolle 60 weitere Gene stehen („late genes“) (Claverys *et al.*, 2006). Darunter sind nicht nur die Gene, die für die Kompetenz verantwortlich sind, sondern auch Gene für Autolysine, die den Prozess des „Brudermords“ bedingen. Hierbei werden nicht kompetente Pneumokokken lysiert. Die frei werdende DNA kann von kompetenten Pneumokokken aufgenommen und über homologe Rekombination ins Genom

integriert werden. Dieser als Allolyse bezeichneter Vorgang führt zu genetischer Diversität (Claverys & Havarstein, 2007). Weiterhin werden bei diesem Vorgang u.a. Proteine freigesetzt wie die  $\beta$ -Galaktosidase oder der Hauptvirulenzfaktor Pneumolysin, die neue Ressourcen erschließen oder die Virulenz erhöhen (Guiral *et al.*, 2005).

### 2.3.2.1 Epidemiologie, Prävention und Therapie

Weltweit gesehen ist *S. pneumoniae* der häufigste Verursacher von nichtnosokomial erworbener Lungenentzündung (van der Poll & Opal, 2009). Weiterhin lösen Pneumokokken lokale Infektionen des Mittelohrs (Otitis media) und der Nasennebenhöhlen (Sinusitis) aus. Bei invasiven Erkrankungen ausgehend von einer Septikämie kann es zu einer Infektion des Bauchfells (Peritonitis), der Gelenke und der Gehirnhäute (Meningitis) kommen (Bogaert *et al.*, 2004). Die WHO schätzt die Anzahl ernsthafter Pneumokokkenenerkrankungen auf 14,5 Millionen Fälle weltweit mit 826.000 Todesfällen von Kindern unter 5 Jahren. Besonders betroffen sind die Entwicklungsländer, da 61 % der Todesfälle in zehn Ländern Asiens und Afrika auftreten (WHO, 2009a) und die Pneumokokken Septikämie verursacht 25 % aller verhinderbaren Todesfälle von Kindern unter 5 Jahren (Kadioglu *et al.*, 2008). Betrachtet man die Pneumokokken-Meningitis, so werden weltweit 103.000 Fälle verzeichnet mit einer gemittelten Letalitätsrate von 59 %. Die geringste Letalitätsrate findet man mit 29 % in der „Western Pacific“ Region und die höchste in Afrika mit 73 %. Bezüglich der Inzidenzrate, die in Afrika ebenfalls die höchste ist (38/100.000), findet man die geringste in Europa mit 6 Fällen pro 100.000 Einwohner. Epidemiologisch interessant sind weiterhin invasive Pneumokokken-Erkrankungen, die weder eine Lungen- noch eine Hirnhautentzündung (NPNM) hervorrufen: Weltweit beliefen diese sich auf 538.000 Fälle, von denen 65.000 als ernsthaft eingestuft wurden. Zur Übersicht wurden die Fallzahlen für „Weltweit“, Europa und Deutschland in Tab. 2.4 zusammengestellt (O'Brien *et al.*, 2009; WHO, 2007). In Deutschland treten jährlich schätzungsweise 12.000 Todesfälle durch Pneumokokken-Erkrankungen auf, davon 47 Todesfälle von Kindern unter fünf Jahren. Die größte Risikogruppe sind Menschen über 60 Jahre. Weiterhin sind Kinder unter zwei Jahren ebenfalls stärker gefährdet.

**Tab. 2.4: Pneumokokkenerkrankungen von Kindern unter 5 Jahren**

		<b>Weltweit</b>	<b>Europa</b>	<b>Deutschland</b>
<b>Gesamt</b>	Fälle	14.441.000	259.900	10.658
<b>Pneumonie</b>	Fälle	13.800.000	238.000	9.644
	Todesfälle	741.000	13.000	23
	Mortalität	5,4 %	5,5 %	0,2 %
<b>Meningitis</b>	Fälle	103.000	3.300	148
	Todesfälle	60.500	1.300	12
	Mortalität	58,7 %	39,4 %	8,1 %
<b>NPNM</b>	Fälle	538.000	18.600	866
	Todesfälle	25.200	800	12
	Mortalität	4,7 %	4,3 %	1,4 %

**NPNM** = non pneumonia non meningitis; Quelle: Zusammenstellung aus (O'Brien *et al.*, 2009; WHO, 2007)

Neben dem Alter spielen weitere Risikofaktoren eine Rolle, die eine Schwächung des Immunsystems bedingen. Solche Faktoren sind chronische Erkrankungen, Splenektomie und Immunsuppression/ Immuninkompetenz. Ein Beispiel für eine chronische Erkrankung ist Asthma bronchiale. Eine Immunsuppression tritt bei Krebspatienten mit Chemotherapie auf, während AIDS-Patienten unter einer HIV-verursachten Immuninkompetenz leiden (NRZ, 2002). Weitere Risikofaktoren sind Alkoholismus und Diabetes mellitus (van der Poll & Opal, 2009). Der stärkste unabhängige Risikofaktor ist Rauchen. Raucher erleiden vier Mal häufiger eine invasive Pneumokokkenerkrankung als Nichtraucher (Nuorti *et al.*, 2000). In mehreren Studien konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen einer Influenzainfektion mit einer sekundären Pneumokokkenerkrankung hergestellt werden (van der Poll & Opal, 2009). Mittlerweile geht man sogar davon aus, dass die meisten Todesfälle während der Spanischen Grippepandemie von 1918 durch eine sekundäre Pneumokokkenpneumonie vor dem Hintergrund mangelnder ärztlicher Versorgung und Hygiene, Krieg und Mangelernährung verursacht wurden (McAuley *et al.*, 2007).

Pneumokokken sind prinzipiell mit Penicillinen und anderen  $\beta$ -Lactamantibiotika behandelbar. Probleme bei der Behandlung sind zum einen die rasanten Verläufe von Pneumokokkeninfektionen, so stirbt jeder zweite Patient trotz Antibiotikabehandlung innerhalb von 48 Stunden (Hülße *et al.*, 1999). Zum anderen steigen die Fallzahlen von Erkrankungen mit antibiotikaresistenten Pneumokokken weltweit stark an (Yu *et al.*, 2003).

Während in Deutschland noch moderate Resistenzraten von beispielsweise 9 % Penicillin- und 31 % Makrolidresistenz zu verzeichnen sind, ist die Lage in einigen süd- und osteuropäischen Ländern mit 30-50 % Penicillin- und bis 60 % Makrolidresistenz wesentlich dramatischer (NRZ, 2002; RKI, 2006). Entsprechend den Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch Institut (RKI), Berlin, werden Kinder im 2. Monat mit einem 7-valenten Pneumokokken-Konjugatimpfstoff (Serotypen 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) geimpft. Dieser Impfstoff wird auch für gefährdete Kleinkinder bis 5 Jahre empfohlen. Für Risikogruppen und Personen über 60 Jahre ist ein 23-valenter Polysaccharidimpfstoff (Serotypen 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F) vorgesehen. Dieser Impfstoff ist für Kleinkinder ungeeignet, da Polysaccharidimpfstoffe bei Kleinkindern keine Immunreaktion auslösen (Ruckinger *et al.*, 2009b). Auch die schützende Wirkung für Erwachsene wird kontrovers diskutiert (Huss *et al.*, 2009; Musher *et al.*, 2010). Durch die Einführung des 7-valenten Konjugatimpfstoffes (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) konnte in Deutschland die Inzidenz invasiver Pneumokokken-erkrankungen verringert werden (Ruckinger *et al.*, 2009a). Auch weltweit gehen nach Einführung des Konjugatimpfstoffes die Fallzahlen zurück (O'Brien *et al.*, 2009). Allerdings hat die Verwendung dieses Impfstoffes zur Folge, dass Serotypen, die nicht abgedeckt werden, vermehrt auftreten. Um dieser Entwicklung entgegen zu wirken, ist ein 13-valenter Konjugatimpfstoff (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F) entwickelt worden, der in Deutschland seit Ende 2009 zugelassen ist (PEI, 2011).

#### 2.3.2.2 Kolonisation und Adhärenz

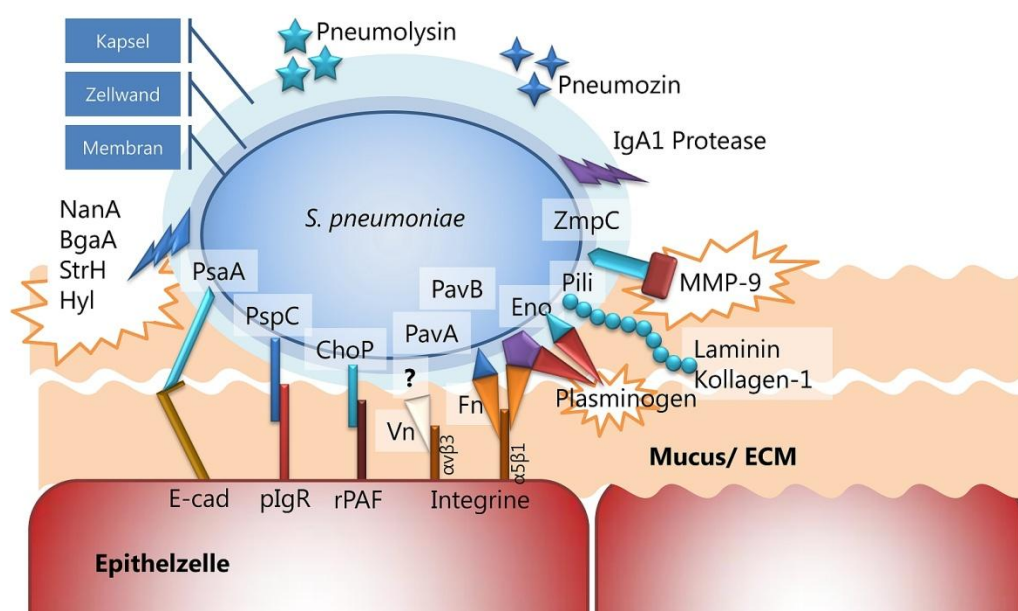
Pneumokokken besiedeln die Mukosa des Naso-Oropharynx (Schleimhäute des Mund- und Nasanrachenraumes) im oberen Respirationstrakt. Verläuft diese Kolonisation asymptomatisch, spricht man vom sogenannten Trägerstatus. Durch Tröpfcheninfektion über die Luft bei engem Kontakt werden die Pneumokokken von Mensch zu Mensch übertragen. Die Erstbesiedlung erfolgt im Kleinkindalter und die Trägerrate nimmt mit zunehmendem Alter stetig ab. Man geht davon aus, dass Kleinkinder das wichtigste Reservoir für Pneumokokken bilden (Kadioglu *et al.*, 2008).

Die Kapsel ist der wichtigste Virulenzfaktor der Pneumokokken, da unbekapselte Stämme weitestgehend avirulent sind (Austrian, 1981). Ohne Kapsel sind diese Stämme zwar noch in der Lage den Nasopharynx im Mausmodell zu besiedeln, verbleiben allerdings im luminalen

Mukus. Nur bekapselte Stämme können diesen effektiv durchdringen und erhalten auf diese Weise Zugang zum Epithel des Nasopharynx. Die Adhäsion an Epithelzellen ist die Voraussetzung für eine persistierende Kolonisation (Nelson *et al.*, 2007). Weiterhin müssen sich die Pneumokokken gegen die vorherrschende Flora durchsetzen beispielsweise gegen *H. influenzae* oder andere  $\alpha$ -hämolytische Streptokokken (*S. salivarius/ sanguis/ mutans*) (Ghaffar *et al.*, 1999). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Gegenwart von Meningokokken (*N. meningitidis*) das Wachstum von Pneumokokken fördert, diese jedoch das Wachstum von *N. meningitidis*, *H. influenzae* und *M. catarrhalis* durch die Sekretion von  $H_2O_2$  hemmen (Pericone *et al.*, 2000). Durch den bereits erwähnten Prozess der Allosyze (2.3.2) und durch die Produktion spezieller Bakteriozine (Pneumozine) können verschiedene Pneumokokkenstämme untereinander konkurrieren (Dawid *et al.*, 2007).

Dringen Pneumokokken in den Nasenrachenraum ein, interagieren sie zunächst mit der extrazellulären Matrix (ECM) (**Abb. 2.17**). Diese wird durch die Pneumokokken abgebaut und liefert nicht nur potentielle Nährstoffe, sondern es werden möglicherweise andere Strukturen für eine Adhärenz freigelegt (Kadioglu *et al.*, 2008). Zu diesem Zweck tragen die Pneumokokken auf ihrer Oberfläche drei verschiedene Exoglykosidasen: Eine Sialidase (NanA), eine  $\beta$ -Galaktosidase (BgaA) und eine  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase (StrH). Diese Enzyme spalten terminale Zucker von sog. Glykokonjugaten wie Mukopolysaccharide, Proteoglykane und Glykoproteine. Ein weiterer Angriffspunkt ist Hyaluronan, ein lineares Polysaccharid, das die Pneumokokken mit einer Hyaluronidase (Hyl) spalten können, die über ein LPXTG-Motiv in der Zellwand verankert ist (Jedrzejewski *et al.*, 2002). Weiterhin bedienen sich die Pneumokokken wirtseigener Proteasen, um Teile der ECM zu degradieren. Eine ebenfalls über ein LPXTG-Motiv verankerte Zink-Metalloprotease (ZmpC) aktiviert durch Spaltung des Proenzym die humane MMP-9 (Matrix-Metalloprotease), die in der Lage ist Kollagen abzubauen (Oggioni *et al.*, 2003). Schließlich verfügt *S. pneumoniae* über die Möglichkeit Plasminogen zu binden und zu aktivieren. Plasminogen ist ein Zymogen der Protease Plasmin, welche eine Schlüsselrolle in der Fibrinolyse spielt und auch Komponenten der ECM degradieren kann (Paterson & Orihuela, 2010). Plasmin(-ogen) wird auf der Zelloberfläche von Pneumokokken durch die Enzyme Enolase (Bergmann *et al.*, 2001; 2003) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gebunden (Bergmann *et al.*, 2004). Diese Enzyme sind innerhalb der Zelle Teil der Glykolyse und erfüllen auf der Zelloberfläche eine weitere Funktion, weshalb sie auch als „moonlighting proteins“ bezeichnet werden

(Bergmann & Hammerschmidt, 2006). Das Überwinden des Mukus und die partielle Degradation der ECM schaffen die Voraussetzung für eine Adhärenz der Pneumokokken an die Epithelzellen. Pneumokokken bedienen sich hierbei zum einen zweier Brückenmoleküle, Fibronectin und Vitronectin, und zum anderen direkter Interaktion zwischen Zelloberflächenmolekülen (**Abb. 2.17**). Die genannten Brückenmoleküle sind Strukturproteine der ECM und werden über verschiedene Integrine an der Zelloberfläche verankert. Der Bindungspartner für Vitronectin ist noch unbekannt, es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Bindung die Aufnahme von Pneumokokken in die Zellen auslöst (Bergmann *et al.*, 2009). Für Fibronectin ist der Bindungspartner PavA (Pneumococcal adherence and virulence factor



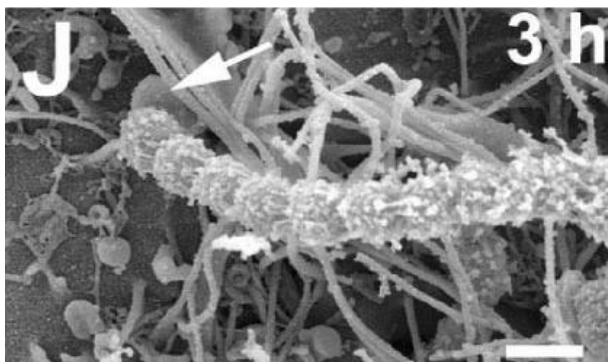
**Abb. 2.17:** SPN Virulenzfaktoren bei der Kolonisierung des Respirationstrakts

Die **Kapsel** ermöglicht das Durchdringen der Mucusschicht und bietet Schutz vor Opsonophagozytose. Sekretorische IgA Antikörper werden von der **IgA1 Protease** gespalten. **Pneumozine** wirken bakteriozid gegen Artgenossen. Die Aktivität von **NanA** (Neuramini-dase A), **BgaA** ( $\beta$ -Galaktosidase) und **StrH** ( $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase) (spalten terminale Zucker von Glykokonjugaten) und **Hyl** (Hyaluronidase) ermöglicht eine gezielte Manipulation und einen Abbau von ECM Komponenten. **Pili** ermöglichen die Adhäsion an Strukturen der ECM und der Wirtszelloberfläche. Über **Eno** (Enolase und GAPDH) **PavB** (pneumococcal adherence and virulence) und **ZmpC** (Zink-Metalloprotease) werden Wirtsproteasen wie **Plasminogen** und **MMP-9** (Matrix-Metallo-Protease, eine Kollagenase) zur ECM Degradation (☀) rekrutiert. Adhäsion an Epithelzellen kann direkt oder über Brückenmoleküle vermittelt werden. **PspC** (pneumococcal surface protein C) interagiert mit dem polymeren Immunoglobulinrezeptor (**pIgR**) und Phosphorylcholin (**ChoP**) der Zellwand bindet an den **PAF** Rezeptor (platelet activating factor). Das Lipoprotein **PsaA** (pneumococcal surface antigen) kann direkt mit dem epithelspezifischen Adhäsionsmolekül (**E-cad**, E-Cadherin) interagieren. Hingegen wird eine Adhäsion an Wirtszellintegrine über die Brückenmoleküle Fibronectin (**Fn**) und Vitronectin (**Vn**) an **PavA**, **PavB** und noch unbekannte Oberflächenmoleküle (?) ermöglicht. **Pneumolysin** hemmt u.a. den Cilienschlag des Bronchiolarepithels und hilft somit bei der Ausbreitung in den unteren Respirationstrakt. Zusammengestellt aus: (Bergmann & Hammerschmidt, 2006; Bergmann *et al.*, 2009; Bogaert *et al.*, 2004; Despommier *et al.*, 2005; Kadioglu *et al.*, 2008; Lofling *et al.*, 2011)

A), der eine bedeutende Rolle bei der Kolonisierung einnimmt (Pracht *et al.*, 2005). Einige Pneumokokkenstämme sind in der Lage pilusartige Strukturen auszubilden, die im Genom auf sog. „pathogenicity islets“ (PI-1, PI-2) codiert sind. Sie vermitteln Adhäsion an Strukturen der ECM wie Fibronectin, Kollagen-1 und Laminin (Hilleringmann *et al.*, 2008) und noch unbekannten Strukturen auf der Wirtszelloberfläche (Lofling *et al.*, 2011). In den Bereich der direkten Wechselwirkung zwischen Zelloberflächenmolekülen von Pneumokokken und humanen Epithelzellen sind drei wichtige Bindungspaare zu nennen: Das „pneumococcal surface protein C“, PspC (synonym zu CbpA, SpsA), bindet an den polymeren Immunglobulin-rezeptor (pIgR) (Grab *et al.*, 2009; Hammerschmidt *et al.*, 2000) und das Lipoprotein PsaA (pneumococcal surface antigen A) bindet an E-Cadherin (Anderton *et al.*, 2007), letzteres ist ein klassisches Zell-Zelladhäsionsprotein von Epithelzellen. Schließlich tragen Pneumokokken in ihrer Zellwand Phosphorylcholin (ChoP), an welches Cholinbindepoteine wie PspC nicht kovalent gebunden werden. Dieses ChoP kann allerdings auch mit dem Rezeptor für den Blutplättchenaktivierungsfaktor (PAFr, platelet activating factor receptor) interagieren, der als Reaktion auf die Entzündungsreaktion hochreguliert wird (Cundell *et al.*, 1995a; Hammerschmidt, 2006).

Für den Prozess der Adhäsion kann die Kapselexpression der Pneumokokken reguliert werden. Durch den genetischen Prozess der Phasenvariation kann die Koloniemorphologie von opaque (matt; stark bekapselt) zu transparent (weniger bekapselt) wechseln. Transparente Phänotypen kolonisieren erfolgreicher den Nasopharynx (Weiser *et al.*, 1994). *In vitro* zeigte sich, dass Pneumokokken, die eng an Epithelzellen binden, eine geringere Bekapselung aufweisen (Hammerschmidt *et al.*, 2005) (**Abb. 2.18**).

Für eine erfolgreiche Kolonisation müssen die Pneumokokken sich auch gegen das



**Abb. 2.18:** Adhärenzinduzierte Kapselreduktion  
Epithelzellen (Hep-2) wurden mit SPN A66 infiziert. Der proximale Kokkus (Pfeil) zeigt eine geringere Bekapselung als die distalen Kokken. Aus: (Hammerschmidt *et al.*, 2005)

Immunsystem zur Wehr setzen. Sekretorische IgA1-Antikörper werden mittels der IgA1-Protease, eine weitere Zink-Metalloprotease, abgebaut. Die Degradation der IgA1 Antikörper trägt zum Schutz vor Opsonophagozytose durch Neutrophile bei. Diese Zellen der angeborenen Immunantwort infiltrieren das Gewebe nach Stimulation durch Osmosestress der



Epithelzellen, der durch die Aktivität des porenformenden Toxins Pneumolysin hervorgerufen wird. In der Regel überleben die Pneumokokken die Infiltration mit Neutrophilen und können persistieren (Kadioglu *et al.*, 2008). Für eine erfolgreiche Bekämpfung von Pneumokokken auf der Mukosa des Naso-Oropharynx ist ein hoher IgG-Antikörperspiegel wie er nach einer Vakzinierung auftritt und vor allem eine zelluläre Immunantwort mit der Entwicklung einer spezifischen CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>17 Zellpopulation notwendig. Das Cytokin Interleukin 17A rekrutiert effektiv professionelle Phagozyten wie Makrophagen und Neutrophile, die erfolgreich die Pneumokokken bekämpfen (Malley, 2010; McCool & Weiser, 2004).

Eine erfolgreiche Besiedlung des oberen Respirationstraktes setzt eine fortdauernde Adhäsion an Epithelzellen voraus. Hierfür müssen sich die Pneumokokken erfolgreich gegen inner- und zwischenartliche Konkurrenz durchsetzen und sich gegen die Verteidigungsstrategien des Wirts behaupten. Die Persistenz der Bakterien ermöglicht die Ausbreitung innerhalb des Wirts in andere Bereiche wie die Nasennebenhöhlen, das Mittelohr oder die Alveoli der Lungen aber auch die Ausbreitung innerhalb der Wirtspopulation.

#### 2.3.2.3 Infektion und Transmigration

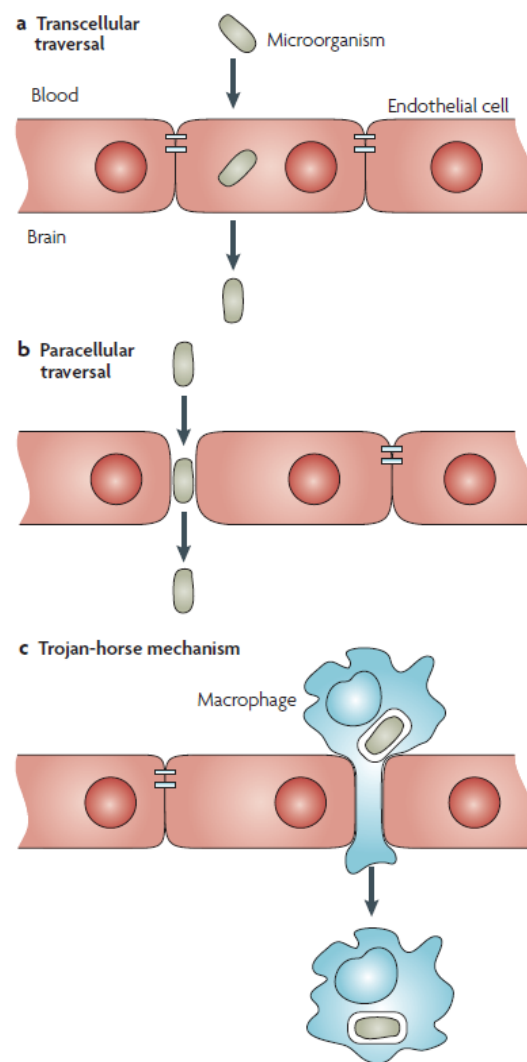
Ausgehend von einer persistierenden Kolonisierung können die Pneumokokken in Wirtsbereiche vordringen, die in der Regel nicht von Bakterien besiedelt werden. In diesem Fall spricht man von einer invasiven Pneumokokkenerkrankung (IPD, invasive pneumococcal disease). In die Lunge gelangen die Pneumokokken durch Aspiration. Die Zilien des Atemwegepithels, die für Transport von Mukus mit eingefangenen Schmutzpartikeln und Bakterien zur Speiseröhre sorgen, werden durch das Pneumolysin der Pneumokokken funktionsunfähig (Ziliostasis) (Feldman *et al.*, 1990; Hirst *et al.*, 2004). Dadurch können die Pneumokokken leichter in die Lunge vordringen. Um eine Meningitis auszulösen, müssen die Pneumokokken über mehrere Gewebefbarrieren transmigrieren und das ZNS infizieren. Den Blutstrom erreichen sie, nachdem sie das Alveolarepithel und das Kapilarendothel überwunden haben (Paterson & Orihuela, 2010). Über das Blutgefäßsystem breiten sie sich im ganzen Körper aus und invadieren schließlich das ZNS über die Blut-CSF- oder Blut-Hirnschranke (Hahn *et al.*, 2004). Ein weiterer Infektionsweg wurde im Mausmodell untersucht: Pneumokokken können ausgehend von einer intranasalen Inokulation das Gehirn auf nichthämatogenem Wege zu infizieren. Postuliert wird ein axonal retrograder Weg über

olfaktorische Nervenbahnen. Allerdings ist unklar, ob dieser Infektionsweg für den Menschen relevant ist (Marra & Brigham, 2001; van Ginkel *et al.*, 2003).

Die Überwindung von Zellbarrieren epithelialer oder endothelialer Art ist auf drei Weisen möglich (**Abb. 2.19**). Pneumokokken können über die Adhäsion an Wirtszelloberflächenmoleküle ihre Aufnahme in die Zelle veranlassen. Dieser transzelluläre Weg erfordert die Freisetzung auf der anderen Zellseite oder die Zerstörung der Wirtszelle (**Abb. 2.19a**). Der zweite Weg führt die Pneumokokken parazellulär, also zwischen den Zellen hindurch. Hierfür müssen interzelluläre Bindungen gelöst oder ganze Zellen zerstört werden (**Abb. 2.19b**). Das

von Pneumokokken sezernierte Pneumolysin ist ein cholesterinabhängiges, porenformendes Zytolysin und Ursache für Gewebeschäden am Alveolarepithel (Rubins *et al.*, 1993) und am Gehirndothel (Zysk *et al.*, 2001). Die dritte Möglichkeit wird als „trojan horse mechanism“ bezeichnet und beschreibt den Transport der Bakterien im Inneren von Leukozyten über die Gewebebarriere (**Abb. 2.19c**). Auch bei diesem Weg müssen die Pathogene intrazellulär überleben und nach erfolgter Transmigration aus der Zelle entkommen. Hinsichtlich der Pneumokokken gibt es bisher keine Erkenntnisse darüber, dass sie in der Lage sind diesen Mechanismus zu nutzen.

Eine Möglichkeit, das Mukosaepithel zu überwinden, ist die Ausnutzung eines rezeptorvermittelten Transzytoseweges. Den pIgR-Mechanismus nutzten die Epithelzellen, um IgA- und IgM-Antikörper aus dem Blut auf die Mukosa des Respirationstrakts zu transferieren. Das Adhäsionsmolekül PspC bindet pIgR (**Abb. 2.17**), die Pneumokokken



**Abb. 2.19: Wege über die Blut-Hirnschranke**

**a)** SPN können durch Adhäsion ihre Aufnahme in Zellen stimulieren. Sie nehmen den Weg durch die Zellen und werden auf der anderen Seite freigesetzt (transzellulär). **b)** Der Weg zwischen den Zellen hindurch (parazellulär) erfordert die Auflösung von Zell-Zellverbindungen oder die Zerstörung ganzer Zellen. **c)** Bakterien können innerhalb von Makrophagen oder anderen Leukozyten die Endothelbarriere passieren („trojan horse mechanism“). Abb. aus (Nikolskaia *et al.*, 2008).

werden in die Zelle aufgenommen und retrograd über die Epithelbarriere transportiert (Elm *et al.*, 2004; Grab *et al.*, 2009). PspC kann weiterhin an Faktor H binden, welcher wiederum Glukosaminoglykane auf Lungenepithelzellen erkennt und eine Aufnahme in die Zelle initiiert (Agarwal *et al.*, 2010). Der oberflächenassoziierte Faktor H ist ein Regulator des Komplementsystems und kann den Komplementfaktor C3b inaktivieren (Zipfel & Skerka, 2009). Damit entfliehen die Bakterien der Komplementsystem-vermittelten Zellyse. Interessanterweise kann Faktor H aber auch das CR3-Integrin binden, welches auf PMNs (polymorphkernige Leukozyten) zu finden ist und die Aufnahme in diese Zellen veranlassen (Agarwal *et al.*, 2010). Aber gerade dieser Aufnahme versuchen die Pneumokokken durch die Inhibierung der Opsonophagozytose zu entgehen (Hyams *et al.*, 2010). Ein weiterer Aufnahmemechanismus, der für Epithel- und Endothelzellen gezeigt wurde, ist die Vitronektin-vermittelte Internalisierung. Pneumokokken binden an Vitronektin, welches über  $\alpha\beta 3$ -Integrin auf der Zelloberfläche verankert ist. Die Signaltransduktion läuft über Kinasen, wie die ILK (Integrin-linked Kinase) und aktiviert eine Aktinzytoskelett-abhängige Aufnahme in die Zelle (Bergmann *et al.*, 2009).

Sind Pneumokokken in die Blutbahn vorgedrungen, können sie die BHS überwinden. Bisher wurde für diesen Bereich folgender Mechanismen beschrieben. Als Folge einer cytokinstimulierten Entzündungsreaktion wird der PAF-Rezeptor verstärkt auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert. Das Phosphorylcholin der bakteriellen Zellwand interagiert mit dem PAF-Rezeptor, der der rezeptorvermittelten Endozytose von PAF dient. Nach der Aufnahme des Liganden wird der Rezeptor zur apikalen Zelloberfläche zurück transportiert. Sind Pneumokokken gebunden, wird eine Transzytose zur basolateralen Seite ausgelöst. Bei der PAFr-vermittelten Transzytose haben Pneumokokken mit transparentem Kapselphänotyp wesentlich höhere Überlebenschancen als Pneumokokken mit opakem Phänotyp (Ring *et al.*, 1998). Ein Schlüsselregulator für die intrazelluläre Umleitung der pneumokokkenhaltigen Endozytosevesikel scheint  $\beta$ -Arrestin zu sein.  $\beta$ -Arrestine binden an Clathrin und interagieren mit den Steuerproteinen des Vesikeltransportsystems (Radin *et al.*, 2005). Für den ZNS-Tropismus vieler Pathogene scheint der Lamininrezeptor eine Zielstruktur zu sein. Dieser Transmembranrezeptor bindet auf der Zelloberfläche von Gehirndothelzellen Komponenten der ECM wie Laminin, Kollagen-1 und Elastin (Jaseja *et al.*, 2005). Eine Studie von Orihuela *et al.* belegt, dass der Lamininrezeptor von CbpA der Pneumokokken aber auch von PilQ der Meningokokken und OmpP2 von *H. influenzae* gebunden wird. Dies wird von

den Autoren als ein wichtiger Schritt diskutiert, um die PAFr-induzierte Endocytose auszulösen (Orihuela *et al.*, 2009). Zellkulturinfektionsstudien und Versuche im Mausmodell zeigen, dass NanA am Prozess der ZNS-Transmigration beteiligt ist. Die Neuraminidase A auf der Oberfläche der Pneumokokken führt zu einer Aktivierung von HBMEC-Zellen, infolge dessen eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird. Neutrophile werden angelockt und die Permeabilität der BHS im Mausmodell steigt an (Banerjee *et al.*, 2010). Neben den molekularen Faktoren spielen auch systemische eine Rolle. Beispielsweise hängt die Wahrscheinlichkeit, die BHS zu überwinden, von der Stärke der Bakteriämie ab (Nikolskaia *et al.*, 2008; Papadopoulos *et al.*, 2001). Die schweren Gewebeschäden, die bei einer Pneumokokken-Meningitis auftreten, sind zum einen die Folge der Zytotoxizität des Pneumolysins, die durch die Freisetzung von Wasserstoffperoxid noch verstärkt wird. Zum anderen werden die Schäden durch die Aktivität proinflammatorischer Immunzellen noch vergrößert (Marriott *et al.*, 2008). Weiterhin steht Pneumolysin in direktem Zusammenhang mit der als Folge einer Meningitis auftretenden Taubheit (Wellmer *et al.*, 2002).

Für Pneumokokken wurden zahlreiche Mechanismen beschrieben, die zur Adhärenz an und Invasion in humane Zellen führen. Da Pneumokokken per definitionem keine intrazellulär lebenden Bakterien sind, wird ein intrazelluläres Stadium nur als Teil des Transmigrationsprozesses verstanden. Intrazelluläres Trafficking, Exozytose und Evasion der Pneumokokken sind Prozesse, die nur wenig verstanden sind.

## 2.4 ZIELSETZUNG UND VORGEHENSWEISE

Diese Arbeit gliedert sich in die drei Themenbereiche BHS-Modelle, Transmigration von Trypanosomen und Transmigration von Streptokokken. Der Schwerpunkt lag auf Transmigrationsuntersuchungen mit dem optimierten ECV304-C6 BHS-Modell.

Ausgehend von früheren Arbeiten (Hurst & Fritz, 1996; Untucht, 2007) sollte das ECV304-C6 BHS-Modell für Transmigrationsuntersuchungen weiterentwickelt werden und das optimierte Modell sollte charakterisiert werden. In einem ersten Schritt sollten die Kulturbedingungen für das ECV304-C6 Modell optimiert werden. Als entscheidendes Kriterium für die Evaluation unterschiedlicher Bedingungen sollte die Impermeabilität des BHS-Modells für eine Überwindung durch den apathogenen *E. coli* HB101 sein. In einem zweiten Schritt sollte die selektive Permeabilität für den neuronvasiven *E. coli* K1 demonstriert werden und die Zellstruktur des BHS-Modells sollte durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen charakterisiert werden. In einer Kooperation sollten zusätzlich Arzneistoffpermeabilitäten des optimierten ECV304-C6 Modells evaluiert werden.

Mit dem optimierten ECV304-C6 BHS-Modell sollten verschiedene Aspekte der Transmigration afrikanischer Trypanosomen über die BHS untersucht werden. Das Transmigrationsverhalten der humanpathogenen *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense* und des tierpathogenen *T. b. brucei* sollte analysiert werden ebenso wie der Einfluss der Transmigration von Makrophagen auf die Transmigration von Trypanosomen. Um die Frage zu beantworten, ob Trypanosomen das ZNS als Rückzugsgebiet nutzen können, sollte die trypanosomale Überwindung eines invertierten ECV304-C6 Modell untersucht werden.

Der dritte Themenbereich sollte Transmigrationsuntersuchungen mit verschiedenen klinischen Streptokokkenisolaten umfassen. Es sollte herausgefunden werden, ob die klinische Charakterisierung als Meningitiserreger, als Erreger lokaler Infektionen oder als Isolat aus asymptomatischen Trägern mit der Transmigration über die BHS korreliert. Für diese Fragestellung sollten Isolate von Gruppe B und C Streptokokken sowie von Pneumokokken herangezogen werden. Von klinischen Pneumokokkenisolaten sollten Kapselmutanten erstellt werden. Deren BHS-Überwindung sollte im Vergleich zu den wildtypischen Isolaten im ECV304-C6 sowie im HBMEC BHS-Modell analysiert werden. Hierfür sollte ein für *E. coli* HB101 impermeables HBMEC BHS-Modell etabliert werden und der Expressionsnachweis des für die pneumokokkale BHS-Transmigration wichtigen Lamininrezeptors sollte erfolgen.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 GERÄTE

Für die Durchführung der Experimente wurden nachfolgend aufgelistete Geräte verwendet.

**Tab. 3.1: Alphabetische Geräteliste**

<b>Art des Gerätes</b>	<b>Hersteller &amp; Typ</b>
Absaugpumpe	Gilson Safe Aspiration Station
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Sanyo MCO-18 AIC (UV)
DNA-Gelkammer	GP Kunststofftechnik Mini
Elektroblotter	Peqlab PerfectBlue Semi-Dry Electro Blotter
Fluoreszenzmikroskop	Keyence Biorevo BZ-9000
Feinwaage	Sartorius TE 2145
Geldokumentationsanlage	DC Science Tec DeVision G
Inverses Lichtmikroskop	ZEISS Axiovert 35M
Magnetrührer	IKA RH basic 2 MSH basic yellow line
Manuelle Einkanalpipetten	Rainin pipet lite Brand Transferpette S
Manuelle Mehrkanalpipetten	Rainin pipet lite (12 Kanal)
Mehrfachdispenser	Brand Handy Step® electronic
Nanodrop	PeqLab ND-1000
PCR-Maschine	Peqlab Pqstar 96 Universal Gradient
pH-Meter	Metrohm 827 pH lab
Power supply	Peqlab EV222, EV231
Reagenzgefäßschüttler	Scientific Industries Vortex Genie 2
Reinstwasseranlage	Millipore MilliQ Synthesis A10
Rotisserie	Peqlab Perfect Blot Rotisserie
Rollmischer	Labortechnik Fröbel GmbH, CAT RM5
Schüttelgeräte	Grant-bio PMR-30 IKA KS 130 basic

<b>Art des Gerätes</b>	<b>Hersteller &amp; Typ</b>
SDS-Gelkammer	Biorad Mini-Protean Tetra Cell, Mini-Protean 3
Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific Hera Safe KS-12/ KS-18
SpeedVac	Eppendorf Concentrator 5301
Spektralphotometer	Biochrom Libra S22
Tiefkühlschrank -80 °C	Sanyo MDF U73V
Tischwaage	Sartorius BL 1500
Thermoblock	Eppendorf Thermomixer comfort Peqlab Thriller
UV-Crosslinker	Stratagene UV Stratalinker 2400
Wasserbad	GFL 1002
Zentrifugen	Beckman Coulter Allegra X-12R Hermle Labortechnik Z 216 MK Eppendorf 5424

### 3.2 CHEMIKALIEN UND MEDIEN

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Medienbestandteile wurden von den Firmen Carl Roth, Sigma-Aldrich, AppliChem, BD Biosciences und Fluka bezogen. Zellkulturmedien und Zellkulturmedienzusätze wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, bei den Firmen PAA oder Biochrom bestellt.

### 3.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Verbrauchsmaterialien aller Art wie Einwegpipetten, Pipettenspitzen, Küvetten und Reaktionsgefäße in unterschiedlichen Größen sowie Zellkulturflaschen und „Well“-Platten wurden von den Firmen Sarstedt, Biochrom, BD Falcon, Brand und Greiner bio-one bezogen. Wichtige Produktdaten sind der folgenden Tabelle (Tab. 3.2) zu entnehmen.

**Tab. 3.2: Besondere Verbrauchsmaterialien**

Bezeichnung	Bezugsquelle
Zellkulturflaschen	
25 cm <sup>2</sup> mit Belüftungskappe	Sarstedt, TPP (Biochrom)
75 cm <sup>2</sup> mit Belüftungskappe	TPP (Biochrom)
Multiwellplatten	BD Falcon, Sarstedt,
mit 12, 24 und 96 Vertiefungen, unbehandelte Oberflächen	TPP (Biochrom)
„Companion“-Platten, 24-well Format	BD Falcon (353504)
Membraneinsätze für Multiwellplatten	BD Falcon
PET-Membran, 3 µm PorenØ, 24-well Format	(353096)
PET-Membran, 8 µm PorenØ, 24-well Format	(353097)
Matrigel Invasionskammern	BD BioCoat
PET-Membran mit Matrigel beschichtet, 8 µm PorenØ, 24-well Format	(354480)

**PET** = Polyethylen Terephthalat; Ø = Durchmesser

### 3.4 ORGANISMEN

In dieser Arbeit wurden verschiedene Bakterien sowie eukaryontische Parasiten und Zelllinien verwendet. Diese sind in den folgenden Tab. 3.3, Tab. 3.4 und Tab. 3.5 zu entnehmen. Bei allen verwendeten Trypanosomenstämmen handelt es sich um kulturadaptierte monomorphe Blutformen.

**Tab. 3.3: Bakterienstämme**

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
<i>E. coli</i> HB101	Ohne Fimbrien und defizient in Genen für eine invasive Disseminierung (Huang <i>et al.</i> , 1995; Kim, 2000; Stins <i>et al.</i> , 1999)	(Boyer & Roulland-Dussoix, 1969)
<i>E. coli</i> K1	Pathogen (Neugeborenen-Meningitis)	(Korhonen <i>et al.</i> , 1985)
<b><i>S. pneumoniae</i></b>		
SPN 37	Serotyp 35A (R36A)	NCTC10319
SPN 37 Δcps	Kapselmutante; Kanamycin-R	S. Hammerschmidt, Greifswald



Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
SPN 37 $\Delta$ ply	Pneumolysinmutante; Plasmid pJDC9::ply; Erythromycin-R	S. Hammerschmidt, Greifswald
SPN D39	Serotyp 2; Pathogen im Mausmodell	Avery et al.; 1944
SPN D39 $\Delta$ cps	Kapselmutante; Kanamycin-R	S. Hammerschmidt, Greifswald
SPN D39 $\Delta$ cps $\Delta$ ply	Kapsel- und Pneumolysinmutante; Erythromycin-/Kanamycin-R	S. Hammerschmidt, Greifswald
SPN TIGR4	Serotyp 4;	Tettelin et al.; 2001
SPN TIGR4 $\Delta$ cps	Kapselmutante; Kanamycin-R	S. Hammerschmidt, Greifswald
SPN 53	Serotyp 1; Klinisches Isolat; charakterisiert als „gering invasiv“ (lokale Infektion)	Statens Serum Institut (Dänemark) via S. Bergmann (TU BS)
SPN 55	Serotyp 4; Klinisches Isolat; charakterisiert als „gering invasiv“ (lokale Infektion)	Statens Serum Institut (Dänemark) via S. Bergmann (TU BS)
SPN 57	Serotyp 6B; Klinisches Isolat; charakterisiert als „stark invasiv“ (systemische Infektion)	Statens Serum Institut (Dänemark) via S. Bergmann (TU BS)
SPN 64	Serotyp 23F; Klinisches Isolat; charakterisiert als „stark invasiv“ (systemische Infektion)	Statens Serum Institut (Dänemark) via S. Bergmann (TU BS)
SPN 276	Serotyp 3; Klinisches Isolat; Meningitispatient	M. van der Linden, NRZ Aachen
SPN 277	Serotyp 7F; Klinisches Isolat; Meningitispatient	M. van der Linden, NRZ Aachen
SPN 277 $\Delta$ cps	Eigene Kapselmutante „CUEF“; Kanamycin-R	
SPN 282	Serotyp 7F; Klinisches Isolat; charakterisiert als „nicht invasiv“ (Trägerisolat)	M. van der Linden, NRZ Aachen
SPN 289	Serotyp 7F; Klinisches Isolat; isoliert aus dem Blut eines Meningitispatienten	M. van der Linden, NRZ Aachen
SPN 290	Serotyp 7F; Klinisches Isolat; isoliert aus der CSF eines Meningitispatienten	M. van der Linden, NRZ Aachen
<b><i>S. equi ssp. zooepidemicus</i></b>		
C34	Tierisolat	M. Fulde, HZI, Braunschweig
C116	Humanisolat aus einem Meningitispatienten	M. Fulde, HZI, Braunschweig

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
<b><i>S. agalactiae</i></b>		
GBS 143	Serotyp V, Klinisches Isolat, nicht Meningitis-assoziiert	G.S. Chhatwal, HZI, Braunschweig
GBS 151	Serotyp Ia, Klinisches Isolat, Meningitispatient	G.S. Chhatwal, HZI, Braunschweig
GBS 158	Serotyp V; Klinisches Isolat, nicht Meningitis-assoziiert	G.S. Chhatwal, HZI, Braunschweig
GBS 165	Serotyp III R1, Klinisches Isolat, Meningitispatient	G.S. Chhatwal, HZI, Braunschweig
GBS 285	Serotyp unbekannt, CSF Isolat aus Kleinkind mit Meningitis (Alter: 1 Monat, weiblich)	M. van der Linden, NRZ Aachen
GBS 286	Serotyp 5, Blutisolat aus Meningitispatientin (Alter: 67 Jahre, Alkoholikerin, Niereninsuffizienz)	M. van der Linden, NRZ Aachen
GBS 287	Serotyp B3, Vaginaabstrich einer gesunden 30 Jährigen	M. van der Linden, NRZ Aachen
GBS 288	Serotyp B1a, Vaginaabstrich einer gesunden 28 Jährigen	M. van der Linden, NRZ Aachen

**SPN**= *Streptococcus pneumoniae*; **GBS**= Gruppe B Streptokokken; **TU BS** = Technische Universität Braunschweig; Antibiotikum-**R**= Resistenzkassette; **NCTC**= National Collection of Type Cultures

**Tab. 3.4: Trypanosomenstämme**

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
TC221	<i>Trypanosoma brucei brucei</i> ; tierpathogen	(Hirumi <i>et al.</i> , 1980)
STIB900	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> ; humanpathogen (Ostafrika-Schlafkrankheit)	R. Brun, STI Basel (CH)
STIB930	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i> ; humanpathogen (Westafrika-Schlafkrankheit)	R. Brun, STI Basel (CH)

**STI**= Schweizerisches Tropeninstitut

**Tab. 3.5: Eukaryontische Zelllinien**

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
ECV304	Endothelartige Zelllinie, human; Epithelartige Morphologie	(Takahashi <i>et al.</i> , 1990; 1991; 1992) ECACC 92090409
C6	Gliazelllinie, murin (Ratte), aus Gliatumor; Fibroblastenartige Morphologie	(Benda <i>et al.</i> , 1968) ECACC 92091712
HBMEC	Humane, mikrovaskuläre Gehirnendothelzellen (human brain microvascular endothelial cells); Epithelartige Morphologie	(Stins <i>et al.</i> , 2001)
J774	J774A.1 Monozyten-Makrophagen Linie, murin (Maus); Suspensionszellen, adhären nach Aktivierung	DSMZ ACC170

**ECACC**= European Collection of Animal Cell Cultures; **DSMZ**= Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

## 3.5 KULTURMETHODEN

### 3.5.1 BAKTERIEN

Die verwendeten Bakterienstämme werden, soweit nicht anders vermerkt, stets im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Von jedem Stamm werden Glycerinstocks in Kryokonservierungsmedium (Tab. 3.6) angelegt und bei -80 °C kryokonserviert. Während des Einfrierprozesses lagern die Kryoröhrchen in einem mit Isopropanol gefüllten Behälter (Nalgene Cryo 1C Freezing Container). Für jeden Versuchstag werden die Stämme frisch ausgestrichen.

**Tab. 3.6: Medium für die Kryokonservierung von Bakterien**

70 %	Medium (LB für <i>E. coli</i> , THY für Streptokokken)
30 %	Glycerin
Sterilfiltrieren (0,2 µm Filter)	

### 3.5.1.1 *Escherichia coli*

Die *E. coli* Stämme werden auf LB-Agarplatten (Tab. 3.7) kultiviert. Aus dem Kryoröhrchen wird mittels einer ausgeglühten und erkalteten Impföse etwas Impfmateriel entnommen und flächig auf eine Agarplatte ausgestrichen. Die beimpften LB-Platten werden üN bei 37 °C inkubiert. Das Animpfen erfolgt stets am späten Nachmittag des Vortages. Nach der Inkubation wird der Bakterienrasen mittels einer sterilen Impföse abgeerntet und in 1 mL PBS (Tab. 3.8) pro Platte resuspendiert. Für die Bestimmung der Zellzahl /mL wird die optische Dichte (OD) in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 550 \text{ nm}$  bestimmt. Entsprechend der Dichte der Ausgangslösung empfiehlt sich für die OD-Messung eine 1:10 bis 1:100 Verdünnung in PBS. Anhand der Tab. 3.9 wird die Zellzahl abgeschätzt.

**Tab. 3.7: LB-Agar**

---

10 g	Caseinpepton
5 g	Hefeextrakt
5 g	NaCl
15 g	Agar
ad 1000 mL	dH <sub>2</sub> O
Autoklavieren, bei ca. 50 °C gießen	

---

**Tab. 3.8: PBS (10fach)**

---

80 g	NaCl
2 g	KCl
14,4 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
2,4 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
ad 1000 mL	dH <sub>2</sub> O
Autoklavieren	
1:10	Verdünnen für 1faches PBS
pH auf 7,4 einstellen	
Sterilfiltrieren (0,2 µm Filter)	

---

Rezept entsprechend (Sambrook *et al.*, 1989); im Text gilt **PBS**= 1fach PBS, pH 7,4

**Tab. 3.9: Umrechnung *E. coli* OD<sub>550 nm</sub> in Zellzahl/ mL**

OD <sub>550 nm</sub>	Zellzahl/ mL *10 <sup>9</sup>	OD <sub>550 nm</sub>	Zellzahl/ mL *10 <sup>9</sup>
0,47	0,36	2,37	2,00
0,52	0,39	2,53	2,17
0,57	0,43	2,69	2,36
0,63	0,47	2,87	2,56
0,69	0,51	3,04	2,77
0,76	0,56	3,23	3,00
0,84	0,62	3,42	3,24
0,92	0,68	3,61	3,50
1,01	0,74	3,81	3,78
1,10	0,82	4,02	4,07
1,20	0,90	4,24	4,38
1,31	0,99	4,46	4,71
1,42	1,08	4,68	5,07
1,54	1,18	4,91	5,44
1,66	1,29	5,15	5,83
1,79	1,41	5,39	6,25
1,93	1,54	5,64	6,69
2,07	1,69	5,90	7,16
2,22	1,84	6,16	7,65

### 3.5.1.2 Streptokokken

Sowohl Pneumokokken als auch Gruppe B Streptokokken können auf Schafsblutagar (Columbia Agar mit 5 % Schafsblut, BD 221263) und auf THY-Agar (Tab. 3.10) kultiviert werden. Auf letzterem erhöht sich allerdings die Kulturdauer im Brutschrank von einem auf zwei Tage. Das Animpfen erfolgt i.d.R. auf Schafsblutagar üN. Pneumokokken werden am Vortag des Versuchs morgens aus dem Kryostock angeimpft und abends zwischen 18 und 20 Uhr auf eine frische Blutagarplatte überimpft. Für die Versuche werden Streptokokken in der frühen exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Daher werden vor den Versuchen die Stämme von den üN Kulturen mit einer OD<sub>600 nm</sub> = 0,10 - 0,12 in 20 mL THY-Medium in einem

50 mL Röhrchen angeimpft. Die Inkubation erfolgt ohne Schütteln im Brutschrank. Haben die Streptokokken eine  $OD_{600\text{ nm}} = 0,3\text{-}0,4$  erreicht, werden sie bei  $1000 \times g$  für 10 Min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird in PBS resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt werden die Bakterien in 1 mL PBS aufgenommen. Die Einstellung der Zellzahl erfolgt nach einer Abschätzung, nach welcher eine Streptokokkensuspension mit einer  $OD_{600\text{ nm}} = 0,1$  eine Zellzahl von  $10^8$  Bakterien/mL aufweist. Pneumokokken, die eine oder mehrere Selektionsmarker enthalten, werden entsprechend unter Zugabe von Kanamycin, Neomycin oder Erythromycin kultiviert (Tab. 3.11).

**Tab. 3.10: THY-Medium und -Agar**

30 g	Todd-Hewitt Broth	BD #249240
10 g	Hefeextrakt	
(15 g	Agar)	
ad 1000 mL	dH <sub>2</sub> O	
Autoklavieren		

**Tab. 3.11: Verwendete Antibiotika**

Antibiotikum	Konz. der Stammlösung		Gelöst in
Kanamycin	50	mg /mL	ddH <sub>2</sub> O
Neomycin	50	mg /mL	ddH <sub>2</sub> O
Erythromycin	12,5	mg /mL	50 % EtOH p.a. in ddH <sub>2</sub> O

### 3.5.2 TRYPANOSOMEN

Jeder Trypanosomenstamm benötigt ein speziell zusammengesetztes Komplexmedium, das jeweils frisch in kleineren Mengen zu je 50 mL angesetzt wird. Die Grundmedien wie Baltz Basic (Tab. 3.12) und EMEM (Modified Eagle Medium with Earle's salts) können nach Anbruch bis zu drei Monate bei 4  C gelagert werden. Die für die Medien verwendeten Seren (Tab. 3.13) werden nach Erhalt bei 37  C im Wasserbad aufgetaut, in entsprechenden Mengen aliquotiert und bei -80  C eingefroren und gelagert. Auf diese Weise wird eine gleichbleibende Serumqualit t sichergestellt. *Trypanosoma brucei brucei* TC221 wird in Baltz

Complete (Tab. 3.14) kultiviert, welches sich aus Baltz Basic, FCS und einer  $\beta$ -Mercaptoethanollösung (Tab. 3.15) zusammensetzt. Für *T. b. rhodesiense* STIB900 kann einerseits eine Baltzmediumkomposition (Tab. 3.16) und andererseits ein Medium nach Hirumi (Tab. 3.17) mit jeweils Zusätzen von FCS und Pferdeserum verwendet werden. *T. b. gambiense* STIB930 hingegen wird ausschließlich in einem Medium nach Hirumi (Tab. 3.19) mit FCS und Humanserum kultiviert.

**Tab. 3.12: Baltz-Medium Basic Solution**

3 g	HEPES	Fa. Roth 9105.4
500 mg	Glukose Monohydrat	Sigma G-7021
110 mg	Na-Pyruvat	Sigma P-5280
7 mg	Hypoxanthin	Sigma H-9636
2 mg	Thymidin	Sigma T-1895
10,7 mg	Adenosin	Sigma A-4036
14,1 mg	Bathocuproinsulfonat	Sigma B-1125
5 mL	L-Glutamin (200 mM)	PAA M11-004
Lösen in		
50 mL	EMEM	PAA E15-825
pH einstellen mit NaOH auf 7,5		
Steril filtrieren (0,2 $\mu$ m Filter)		
ad 500 mL	EMEM	PAA E15-825
5 mL	NEAA	PAA M11-003
Bei 4 °C lagern (10-12 Wochen)		

**NEAA**= Non Essential Amino Acids; **EMEM**= MEM with Earle's Salts

**Tab. 3.13: Übersicht über verwendete Seren**

FCS	Fötales Kälberserum Lot-Nr. 0991L aus EU-zertifizierten Ländern Südamerikas	Biochrom AG S 0115
FCS	Fötales Kälberserum (Alternative) FCS „GOLD“ EU approved	PAA A15-151
HoS	Pferdeserum	PAA B11-021
HuS	Humanes Serum Off the clot, Type AB	PAA C11-021
Seren werden nicht hitzeinaktiviert		

**Tab. 3.14: Baltz Complete (BMEM)**

8 mL	FCS	
500 µL	β-Mercaptoethanol-Lösung	Tab. 3.15
ad 50 mL	Baltz Basic	Tab. 3.12
Bei 4 °C lagern (10-12 Wochen)		
Steril filtrieren (0,2 µm Filter)		
üN bei 4 °C, dann fertig zur Verwendung		
Bei 4 °C lagern (4-6 Wochen)		

**Tab. 3.15: β-Mercaptoethanol-Lösung (0,14 %ig)**

14,2 µL	β-Mercaptoethanol	Fa. Roth 4227.1
ad 10 mL	dH <sub>2</sub> O	
Steril filtrieren (0,2 µm Filter)		
Immer frisch ansetzen		



**Tab. 3.16: BMEM für *T. b. rhodesiense* STIB900**

7,5	mL	HoS	
5	mL	FCS	
500	µL	β-Mercaptoethanol-Lösung	Tab. 3.15
ad 50	mL	Baltz Basic	Tab. 3.15
Steril filtrieren (0,2 µm Filter)			
üN bei 4 °C, dann fertig zur Verwendung			
Bei 4 °C lagern (4-6 Wochen)			

**Tab. 3.17: HoMEM für *T. b. rhodesiense* STIB900**

7,5	mL	HoS	
5	mL	FCS	
500	µL	β-Mercaptoethanol-Lösung	Tab. 3.15
500	µL	L-Glutamin (200 mM)	
250	µL	Hirumi spezial, 100fach	Tab. 3.18
ad 50	mL	EMEM	
Steril filtrieren (0,2 µm Filter)			
üN bei 4 °C, dann fertig zur Verwendung			
Bei 4 °C lagern (4-6 Wochen)			

**Tab. 3.18: Hirumi spezial, Stammlösung 100fach**

68	mg	Hypoxanthin	Sigma H-9636
		Lösen in	
20	mL	1 M NaOH	Sigma 480878
ad 40	mL	dH <sub>2</sub> O	
605	mg	L-Cystein	Sigma C-7352
550	mg	Na-Pyruvat	Sigma P-5280
141	mg	Bathocuproinsulfonat	Sigma B-1125
		pH einstellen mit HCl auf 9,7	
ad 50	mL	dH <sub>2</sub> O	
		Steril filtrieren (0,2 µm Filter)	
		üN bei 4 °C, dann fertig zur Verwendung	
		Bei 4 °C lagern (4-6 Wochen)	

**Tab. 3.19: HuMEM für *T. b. gambiense* STIB930**

7,5	mL	FCS	
3,5	mL	HuS	
500	µL	β-Mercaptoethanol-Lösung	Tab. 1.14
500	µL	L-Glutamin (200 mM)	
250	µL	Hirumi spezial, 100fach	Tab. 1.16
ad 50	mL	EMEM	
		Steril filtrieren (0,2 µm Filter)	
		üN bei 4 °C, dann fertig zur Verwendung	
		Bei 4 °C lagern (4-6 Wochen)	

### 3.5.2.1 Adaptation an andere Medien

Die humanpathogenen Trypanosomenstämme *T. b. gambiense* und *T. b. rhodesiense* reagieren sensibel auf starke Veränderungen im Medium, daher werden sie schrittweise nach ihrem Transfer vom STI in Basel an das neue Medium angepasst. Bei jedem Splittvorgang mit einer Rate von 1:10 wird das alte Medium in Schritten zu 25 % durch neues Medium ersetzt.

Innerhalb von zwei bis fünf Tagen erreichen die Trypanosomen ihre Ausgangsdichte und können erneut 1:10 gesplittet werden. Zeigen die Trypanosomen nach der Medienumstellung nur geringe Wachstumsraten, so kann der Serumanteil auf 20 % HuS bzw. HoS und 20 % FCS erhöht werden oder eine andere Serumcharge verwendet werden. Zeigen die Trypanosomen ihre normale Wachstumsrate, kann i.d.R. der Serumanteil wieder auf die in den Rezepten angegebene Menge reduziert werden. Als Sicherung werden die ungesplitteten Reste in flüssigem N<sub>2</sub> kryokonserviert.

#### 3.5.2.2 Subkultivierung

Die Trypanosomenstämme werden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit ohne Schütteln inkubiert. *T. b. brucei* TC221 verzehnfacht seine Zellzahl innerhalb von 24 h und erreicht eine maximale Zelldichte von  $3\text{-}5 \cdot 10^6$  Trypanosomen /mL. Dieser Stamm wird alle zwei Tage in Raten von 1:10, 1:100 und 1:1000 gesplittet. Eine optimal gewachsene Kultur zeigt eine leichte Trübung des Mediums ohne Gelbfärbung. Die humanpathogenen Arten zeigen ein langsames Wachstum und erreichen eine geringere Endkonzentration. Als Faustregel gilt ein Verzehnfachen der Zellzahl innerhalb von 48 h mit einer maximalen Zelldichte von  $4\text{-}7 \cdot 10^5$  Trypanosomen /mL. Für die Aufrechterhaltung der Trypanosomenkultur werden diese in 24-well Platten in je 1 mL Medium in einem dreifachen Ansatz kultiviert. Alle zwei Tage werden die humanpathogenen Arten 1:10 gesplittet. Hierfür entnimmt man 100 µL Kulturlösung von einer bodennahen Stelle, die im Mikroskop eine gute Dichte an sich bewegendem und ohne tote, verklumpte Trypanosomen aufweist. Werden mehr Trypanosomen gebraucht, werden diese in 25 cm<sup>2</sup> oder 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit Belüftungskappe mit einer maximalen Menge von 5 mL bzw. 15 mL Medium kultiviert.

#### 3.5.2.3 Kryokonservierung

Die Trypanosomenkultur zeigt auch über mehrere Monate hinweg keine Alterungserscheinungen wie beispielsweise eine verringerte Wachstumsrate, trotzdem werden Kryostabilate angelegt und alle vier bis sechs Monate werden Trypanosomen frisch aufgetaut. Das Einfriermedium (Tab. 3.20) besteht aus dem jeweiligen Kulturmedium zuzüglich 10 % DMSO und zusätzlichen 10 % FCS. Gut gewachsene Trypanosomenkulturen werden bei 500 \*g für 10 Min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird in einer entsprechenden Menge 4 °C temperierten Kryomediums resuspendiert, so dass sich eine Zellzahl von  $1 \cdot 10^6$  Trypanosomen /mL ergibt. Die Kryoröhrchen werden mit jeweils

1 mL der Zellsuspension befüllt und üN in einem mit Isopropanol gefüllten Behälter (Nalgene Cryo 1C Freezing Container) bei -80 °C eingefroren. Am nachfolgenden Tag werden die Kryostabilate in flüssigen N<sub>2</sub> überführt.

**Tab. 3.20: Kryomedium für Trypanosomen**

---

80 %	Kulturmedium	
10 %	FCS	
10 %	DMSO	Fa. Roth A994.1
Steril filtrieren (0,2 µm Filter)		
Immer frisch ansetzen		

---

**DMSO**= Dimethylsulfoxid

Für die Reanimation aus flüssigem N<sub>2</sub> werden die tiefgekühlten Kryoröhrchen auf Eis transportiert und sofort im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die Zellsuspension wird in 5 mL 37 °C warmen Kulturmedium aufgenommen und zwecks Entfernung des DMSO bei 500 \*g für 10 Min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird in 1 mL Kulturmedium resuspendiert. Je nachdem wie viele Trypanosomen überlebt haben, kann die Kultur spätestens nach 24 h das erste Mal gesplittet werden. Während *T. b. brucei* TC221 sofort die maximale Wachstumsrate und Zelldichte erreicht, kann dies bei den humanpathogenen Stämmen bis zu drei Wochen dauern.

### 3.5.3 EUKARYONTISCHE ZELLINIEN

Alle Zelllinien werden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit Belüftungskappe im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die folgende Tabelle zeigt die verwendeten Zellkulturmedien und Medienzusätze (Tab. 3.21).

**Tab. 3.21: Zellkulturmedien und Medienzusätze**

<b>Medium für HBMEC</b>			
500	mL	RPMI 1640 inkl. L-Glutamin	PAA E15-840
50	mL	FCS	Tab. 3.13
50	mL	Nu-Serum IV	BD 355104
5	mL	NEAA (100fach)	PAA M11-003
5	mL	MEM vitamins (100fach)	PAA N11-002
1	mL	Natriumpyruvat (100 mM)	PAA S11-003
<b>Medium für J-774A.1</b>			
500	mL	RPMI 1640 inkl. L-Glutamin	PAA E15-840
50	mL	FCS	Tab. 3.13
5	mL	L-Glutamine (200 mM) zusätzlich	PAA M11-004
<b>Medium für ECV304</b>			
500	mL	M199 mit Earle's Salts inkl. L-Glutamin	PAA E15-834
Alternativ:			
500	mL	Quantum 286 inkl. L-Glutamin	PAA U15-818
<b>Medium für C6</b>			
500	mL	Ham's F12 Medium	PAA E15-817
50	mL	FCS	Tab. 3.13
5	mL	L-Glutamine (200 mM)	PAA M11-004

### 3.5.3.1 Subkultivierung

Alle adhärenenten Zellen werden bei einer Konfluenz von 80-90 % mit Raten von 1:2 bis 1:20 gesplittet. Maximal werden die Zellen bis zur 15. Passage kultiviert. Zum Splitten wird das alte Medium entfernt. Der Zellrasen wird mit Hilfe von 5 mL Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst. Dieser Prozess läuft bei den C6-Zellen innerhalb von wenigen Minuten ab. ECV304 und HBMEC werden hingegen bis zu 10 Min im Brutschrank inkubiert. Das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wird mikroskopisch kontrolliert. Lösen sich durch Schwenken große Teile des Zellrasens vom Untergrund ab, werden 5 mL Kulturmedium zugegeben. Durch mehrmaliges kräftiges Auf- und Abpipettieren bei gleichzeitigem Spülen des Flaschenbodens werden die Zellen vereinzelt und die Zellsuspension erscheint homogen trüb. Die Zellen werden entsprechend der gewünschten Splitttraten auf neue Flaschen verteilt und im Brutschrank inkubiert. Die Zelllinie J774 wird nicht trypsinisiert, leicht am Boden haftende

Zellen werden mit einem Zellschaber in Lösung gebracht. Die Zellen werden gut gemischt und direkt auf die neuen Flaschen aufgeteilt.

### 3.5.3.2 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung ermöglicht die Verwendung von Zellen mit ähnlicher Passagenzahl und damit in gleichbleibender Qualität für die Versuche einzusetzen. Für die kontinuierliche Arbeit mit den Zelllinien werden bis zu 20 Arbeitsstabilate sowie bis zu zehn Masterstabilate angelegt. Nach Verbrauch der Arbeitsstabilate werden ausgehend von den Masterstabilaten neue Arbeitsstabilate hergestellt. Für die Kryokonservierung werden die Zellen trypsinisiert und die Zellsuspension wird bei 100 \*g für 5 Min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird in Kryomedium (Tab. 3.22) resuspendiert. Die Zellen einer gutbewachsenen Flasche werden auf zwei Kryoröhrchen zu je 1 mL Kryomedium aufgeteilt und üN in einem mit Isopropanol gefüllten Behälter (Nalgene Cryo 1C Freezing Container) bei -80 °C eingefroren. Am nachfolgenden Tag werden die Kryostabilate in flüssigen N<sub>2</sub> überführt.

Für die Reanimation aus flüssigem N<sub>2</sub> werden die tiefgekühlten Kryoröhrchen auf Eis transportiert und sofort im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die Zellsuspension wird in 14 mL 37 °C warmen Kulturmedium aufgenommen und im Brutschrank inkubiert. Nach 2-3 h, wenn die Zellen adhärent sind, wird das alte, DMSO-haltige Medium verworfen und durch frisches ersetzt. Nach Erreichen von 80-90 % Konfluenz werden die Zellen gesplittet. Die J774-Makrophagen hingegen werden wie die Trypanosomen direkt nach dem Auftauen in 5 mL 37 °C warmen Kulturmedium aufgenommen und zwecks Entfernung des DMSO bei 100 \*g für 5 Min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet wird in 15 mL Kulturmedium resuspendiert und die Zellen werden in den Brutschrank überführt.

**Tab. 3.22: Kryomedium für eukaryontische Zelllinien**

---

80 %	Kulturmedium	
10 %	FCS (zusätzlich)	
10 %	DMSO	Fa. Roth A994.1
	Steril filtrieren (0,2 µm Filter)	
	Immer frisch ansetzen	

---

**DMSO**= Dimethylsulfoxid

## 3.6 MIKROSKOPIE

### 3.6.1 ZELLZAHLBESTIMMUNGEN

In dieser Arbeit wird die Zellzahl von eukaryontischen Zelllinien und von Trypanosomen mit Hilfe von Zählkammern mikroskopisch bestimmt. Nachfolgend werden Regeln für Zellzahlbestimmung definiert, die bei jedem Versuch mit Zellen oder Trypanosomen Anwendung finden.

#### 3.6.1.1 Trypanosomen

Trypanosomen werden in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Eine Fuchs-Rosenthal Zählkammer eignet sich für diesen Zweck nicht, da der Abstand zwischen der Zählkammer und dem plangeschliffenen Deckgläschen doppelt so hoch (200 µm) wie bei einer Neubauer Zählkammer ist. Bei dieser Schichtdicke können sich Trypanosomen wesentlich häufiger senkrecht zur Ebene der Zählkammer stellen und somit beim Zählen übersehen werden. Die Neubauer Zählkammer wird mit 10 µL der auszuzählenden Trypanosomensuspension befüllt. Für die Auszählung eignen sich am besten die Großquadrate in den Ecken des 3\*3 Großquadrate messenden Zählfeldes. Diese unterteilen sich in jeweils 4\*4 Kleinquadrate. Die übrigen Großquadrate sind in kleinere Felder unterteilt. Ungenauigkeiten beim Auszählen resultieren aus sich gerichtet fortbewegenden ebenso wie aus sich teilenden Trypanosomen. Daraus ergeben sich folgende Richtlinien für das Auszählen von Trypanosomenkulturen: Gezählt werden alle Trypanosomen, die sich innerhalb des Großquadrates befinden. Als Grenze gilt die mittlere der drei Umrandungslinien. Während des Zählprozesses werden alle Trypanosomen gezählt, die sich innerhalb eines Kleinquadrates befinden, auch wenn sie dieses „gerade nur“ durchqueren. Alle Teilungsstadien werden solange als „1 Trypanosom“ gezählt, bis die Tochtertrypanosomen als eindeutige Individuen mikroskopisch sichtbar sind. Dies ist bei einer Teilungsrate von 90 % entlang der Längsachse der Fall. Weiterhin werden alle Trypanosomen gezählt, die einen eindeutigen trypanosomoiden Habitus aufweisen, d.h. eine, sich um die eigene Achse drehende und länglich bis lanzettförmige Zelle. Nicht gezählt werden alle trypanosomoiden Partikel ohne Bewegung oder Trypanosomen mit stark „geblähter“ Vakuole, was ein Endstadium in Medien schlechter Qualität sein kann. Für einen verlässlichen Mittelwert werden je drei Großquadrate aus zwei unabhängigen Probennahmen ausgezählt. Aus den sechs Werten wird der Mittelwert gebildet und als mathematisch korrekt gerundete ganze Zahl angegeben. Ist die Trypanosomenzahl über 150 Zellen pro

Großquadrat, wird die Suspension entsprechend verdünnt. Liegt die Trypanosomenzahl unter 10 Zellen pro Großquadrat, werden alle Großquadrate der Zählkammer ausgezählt. Bei zwei unabhängig pipettierten Proben ergibt sich somit der Mittelwert aus 18 Großquadraten. Der Mittelwert der gezählten Trypanosomen multipliziert mit dem Kammerfaktor  $10^4$  und dem Kehrwert der Verdünnung ergibt die Zellzahl pro Milliliter (**Abb. 3.1**). Das Detektionslimit pro Auszählung liegt bei  $5,55 \cdot 10^3$  Trypanosomen pro Milliliter. Dies entspricht einem Trypanosom in 18 Großquadraten.

$$\text{Zellen}_{\text{pro GQ}} * F_{\text{Kammer}} * F_{\text{Verdünnung}} = \text{Zellzahl /mL}$$

**Abb. 3.1:** Zellzahlberechnung in einer Zählkammer.

**F**= Faktor;  $F_{\text{Kammer(Neubauer)}} = 10^4$  /  $F_{\text{Kammer(Fuchs-Rosenthal)}} = 5 \cdot 10^3$

### 3.6.1.2 Eukaryontische Zelllinien

Zellen eukaryontischer Zelllinien werden in einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer ausgezählt. Diese besteht aus  $4 \cdot 4$  Großquadraten, die jeweils in  $4 \cdot 4$  Kleinquadrate unterteilt sind. Vor dem Beladen der Zählkammer wird auf eine ausreichende Durchmischung der Zellsuspension und eine gute Vereinzelung der Zellen geachtet. Die Zählkammer wird mit 15  $\mu\text{L}$  der auszuzählenden Zellsuspension befüllt. Ausgezählt werden jeweils drei Großquadrate aus zwei unabhängig pipettierten Probennahmen. Der Mittelwert wird als mathematisch korrekt gerundete ganze Zahl angegeben. Aus diesem Mittelwert ergibt sich unter Berücksichtigung des Kammerfaktors und der Verdünnung die Zellzahl pro Milliliter entsprechend der Formel in Abbildung 3.1.

### 3.6.2 DOPPELIMMUNOFLUORESZENZMIKROSKOPIE

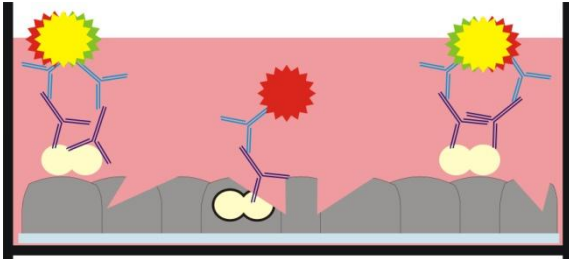
Die Immunofluoreszenzmikroskopie (IF) ist eine Methode, bei der spezifische Antikörper an die gewünschte Zielstruktur binden und im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden können. Bei der sogenannten Doppel-IF (DIF) ist der Primärantikörper gegen die Zielstruktur gerichtet und wird mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, nachgewiesen. Die DIF wird eingesetzt, um die Pneumokokkeninfektion von Zellen zu untersuchen. Durch eine Zweifachfärbung wird es möglich, zwischen adhärenenten und invadierten Pneumokokken zu unterscheiden.



Im ersten Schritt werden die zu untersuchenden Zellen auf autoklavierten Glasdeckgläschen in einer 24-well Platte ausgesät. Hierfür wird der Zellrasen einer gut bewachsenen 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche abtrypsinisiert (3.5.3.1) und die Zellzahl wird auf  $2,0 \cdot 10^5$  Zellen /mL in Zellkulturmedium eingestellt (3.6.1.2). Von der Zellsuspension werden 500 µL pro Deckgläschen ausgesät und üN im Brutschrank kultiviert. Die Pneumokokken werden ebenfalls am Vortag auf Blutagarplatten ausgestrichen und üN im Brutschrank inkubiert (3.5.1.2). Am Infektionstag werden die Pneumokokken abgeerntet und in 20 mL THY mit einer  $OD_{600\text{ nm}} = 0,11$  angeimpft. Die Pneumokokkenkulturen werden bis zur frühen exponentiellen Wachstumsphase, die bei einer  $OD_{600\text{ nm}} = 0,3$  bis  $0,4$  erreicht ist, im Brutschrank kultiviert und anschließend bei  $1000 \times g$  für 10 Min abzentrifugiert, in PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert (3.5.1.2). In Infektionsmedium (Quantum 286 + 0,5 % FCS) wird ein Inokulum von  $1,0 \cdot 10^7$  Bakterien /mL eingestellt. Die am Vortag ausgesäten Zellen werden einmal mit 500 µL Infektionsmedium pro Kammer gewaschen und anschließend mit 500 µL Bakteriensuspension inokuliert. Nach einer dreistündigen Infektionsdauer im Brutschrank werden die Zellen mit frischem Infektionsmedium gewaschen und erneut für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Derweil wird das Inokulum in einer Verdünnungsreihe in PBS auf THY-Agarplatten ausplattiert. Das Infektionsmedium wird abgenommen, die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen und mit 1 % PFA in PBS für mindestens 30 Min fixiert.

Für die DIF-Färbung richtet man sich eine Inkubationskammer her. Diese besteht aus einer viereckigen Petrischale, deren Deckel mit Alufolie eingeschlagen wird. In die Petrischale kommt auf eine Lage feuchtes Whatmanpapier eine Lage Parafilm. Auf den Parafilm werden jeweils die entsprechenden Lösungen pipettiert und die Deckgläschen werden mit der Oberseite auf den Tropfen gelegt. Zwischen den einzelnen Lösungen werden die Deckgläschen aufeinanderfolgend in zwei Bechergläsern mit PBS sanft gespült. Die Inkubation erfolgt jeweils bei RT in der abgedunkelten Inkubationskammer. Im ersten Schritt werden die Deckgläschen für eine Stunde in einem 50 µL Tropfen aus 10 % FCS in PBS inkubiert. Im zweiten Schritt erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper (aufgereinigtes Serum eines gegen Pneumokokken immunisierten Kaninchens). Der Primärantikörper wird in 50 µL pro Deckgläschen in einer 1:100 Verdünnung in PBS mit 10 % FCS eingesetzt. Die Inkubationszeit beträgt mindestens 45 Min. Währenddessen wird der erste Sekundärantikörper (goat anti rabbit ALEXA 488) 1:200 in PBS mit 10 % FCS verdünnt. Die Deckgläschen werden für 30 Min in 50 µL der ersten Sekundärantikörperlösung inkubiert. Auf

diese Weise werden alle extrazellulären Pneumokokken grünfluoreszent eingefärbt. Im nächsten Schritt werden die Zellen auf den Deckgläschen permeabilisiert, um die intrazellulären Pneumokokken detektieren zu können. Für die Permeabilisierung werden pro



**Abb. 3.2:** Doppel-DIF Färbung

Zellen (**grau**) werden auf Deckgläschen kultiviert und mit Pneumokokken (**hellgelb**) infiziert. In zwei aufeinander folgenden Schritten werden zunächst die extrazellulären Bakterien „**grün**“ markiert und nach Permeabilisierung der Zellen werden alle Bakterien „**rot**“ markiert. Die extrazellulären Pneumokokken sind zweifarbig markiert, was sich bei der Bildüberlagerung als **gelb** darstellt. Primärantikörper (**blau**); Sekundärantikörper (**hellblau**); Färbelösung (**rosa**).

Deckgläschen 50 µL einer 0,1 % TritonX-100 Lösung in PBS eingesetzt. Nach 5 Min Inkubation werden die Deckgläschen vorsichtig gespült und der Färbevorgang wird wiederholt. Diesmal wird ein rotfluoreszierender Sekundärantikörper (goat anti rabbit ALEXA 568) in einer 1:350 Verdünnung in 10 % FCS in PBS eingesetzt. Der zweite Sekundärantikörper bindet an extra- und intrazelluläre Pneumokokken, so dass die intrazellulären Bakterien rot fluoreszieren (**Abb. 3.2**). Die extrazellulären Bakterien hingegen sind rot-

und grünfluoreszierend markiert, was in der Bildüberlagerung als Gelb sichtbar wird.

Für die Bildaufnahme und -verarbeitung wird die Software des Mikroskopcomputers verwendet. Diese ermöglicht die Aufnahme mehrerer Gesichtsfelder, die dann automatisch miteinander zu einem größeren Gesamtbild verschmolzen werden. Weiterhin können Bilder aus mehreren Ebenen (Z-Stapel) aufgenommen und zu einer scharfen Fokusebene verrechnet werden. Außerdem werden Filter gegen Unschärfe und Hintergrundrauschen eingesetzt. Die bearbeiteten Bilder werden im JPEG-Format abgespeichert.

### 3.6.3 VORBEREITEN VON REM-PROBEN

Die Rasterelektronenmikroskopie eignet sich sehr gut zur hochauflösenden Darstellung der *in vitro* BHS und damit zur Charakterisierung der strukturellen Integrität des Modellsystems. Für die Fixierung von infizierten oder uninfizierten Transwell-Einsätzen wird sowohl in den Einsatz als auch in die untere Kammer reines Paraformaldehyd (PFA) zugegeben, so dass sich eine Endkonzentration von 5 % PFA einstellt. Die Proben werden üN bei 4 °C gelagert und am nächsten Tag werden die Transwelleinsätze in Fixierungspuffer (Tab. 3.23) überführt.

**Tab. 3.23: Probenfixierungspuffer für die Elektronenmikroskopie**

5 %	PFA	Fa. Roth 0335.2
1 %	Glutaraldehyd	Fa. Roth 4995.1
ad PBS		
Immer frisch ansetzen		

Alle weiteren Schritte wurden in Kooperation mit apl. Prof. Dr. Manfred Rohde vom HZI in Braunschweig durchgeführt. Die Proben wurden in Cacodylatpuffer (0,1 M Cacodylat, 0,01 M  $\text{CaCl}_2$ , 0,01 M  $\text{MgCl}_2$ , 0,09 M Sucrose, pH 6,9) mit 5 % PFA und 1 % Glutaraldehyd überführt. Nach einer Stunde auf Eis wurden die Proben mit TE-Puffer (20 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 6,9) gewaschen und die Membranen wurden vorsichtig aus den Transwelleinsätzen herausgeschnitten. Die Proben wurden in einer Acetonreihe (10/ 30/ 50/ 70/ 90/ 100 % Aceton) schrittweise für 15 Min pro Schritt auf Eis dehydriert. Im Anschluss erfolgte die „Kritische Punkt“-Trocknung mit flüssigem  $\text{CO}_2$  (CPD30, Bal-Tec, Liechtenstein) und die Goldstaubbeschichtung (SCD500, Bal-Tec, Liechtenstein). Die Proben wurden in einem FESEM-Mikroskop (Field Emission Scanning Electron Microscopy; Zeiss DSM 982 Gemini) unter Verwendung des Everhart-Thornley SE-Detektors und des Inlens SE-Detektors in einem Verhältnis von 50:50 mit einer Beschleunigungsspannung von 5 kV bei kalibrierten Vergrößerungen untersucht. Die primäre Speicherung der Rohdaten erfolgte auf MO-Disketten. Mit Hilfe von Photoshop 7.0, Adobe Systems, wurden Kontrast und Helligkeit optimiert sowie Kolorierungen vorgenommen.

### 3.7 VITALITÄT UND WACHSTUM

In diesem Abschnitt werden Methoden beschrieben, die die Grundlage für eine gute Aussagekraft weiterführender Experimente bilden. Hierzu gehört nicht nur die Qualitätssicherung der verwendeten eukaryontischen Zelllinien durch die Überprüfung auf Mykoplasmenkontamination, sondern auch die Untersuchung des Wachstums von Trypanosomen in bestimmten Kulturmedien oder deren Kokultur mit anderen Zelllinien.

### 3.7.1 KONTROLLE AUF MYKOPLASMEN

Um die Kontamination mit Mykoplasmen auszuschließen, wurde ein von der DMSZ entwickelter auf PCR-basierender Test im Labor etabliert (2005a; Uphoff & Drexler, 2005b). Der Nachweis erfolgt über die Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen aus hochkonservierten Bereichen der 16s rDNA im Genom der Mykoplasmen.

#### 3.7.1.1 Die Polymerasekettenreaktion

In einer Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR,) werden mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden (Primer) und einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (TaqPol) bestimmte DNA-Fragmente spezifisch amplifiziert und exponentiell vervielfältigt. Der Nachweis der amplifizierten Fragmente erfolgt mit Hilfe der Gelelektrophorese in einem Agarosegel. Die Fragmente werden ihrer Größe nach aufgetrennt, durch in die DNA interkalierende Farbstoffe (z.B. Ethidiumbromid) unter UV-Licht sichtbar gemacht und abfotografiert. Durch die Verwendung von Größenstandards (Marker) im Gel kann die Größe der Fragmente abgeschätzt werden.

Als Ausgangsmaterial werden Zellkulturüberstände von konfluent gewachsenen Kulturen abgenommen und gut durchmischt. Für den Zellaufschluss werden 200 µL des Überstandes in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und in einem Thermoblock bei 95 °C für 5 Min aufgekocht und auf Eis abgekühlt. Die Proben werden im nächsten Schritt mittels dem RTP® DNA/RNA Virus Mini Kit (Invitek; Protokoll siehe 6.2.2 im Anhang S. 173) aufgereinigt. Dieser Schritt entfernt mögliche PCR-Inhibitoren aus dem serumhaltigen Kulturmedium. Entsprechend dem Pipettierschema (Tab. 3.24) wird die PCR-Lösung hergestellt und die PCR-Reaktion wird gestartet. Die für die Amplifikation verwendeten Primer sind in Tab. 3.25 und der verwendete Reaktionszyklus in Tab. 3.26 aufgelistet. Nach Abschluss der PCR-Reaktion werden die Proben bei 4 °C gelagert.

**Tab. 3.24: Pipettierschema für die Mykoplasmen-PCR**

	(-)K	(-)K + iK	(+)K	Z1	Z1 + iK	...
<b>dNTPs (10 mM)</b> NEB #N0447S	1	1	1	1	1	
<b>5' Primer (0,1 mM)</b>	1	1	1	1	1	
<b>3' Primer (0,1 mM)</b>	1	1	1	1	1	
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	19,3	18,3	18,3	15,3	14,3	
<b>PCR-Puffer (10fach)</b> NEB #B9004S	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	
<b>TaqPol</b> NEB #M0203S	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	
<b>Probe</b>	0	0	0	4	4	
<b>Interne Kontrolle (iK)</b> DSMZ, Braunschweig	0	1	0	0	1	
<b>Positivkontrolle (+)K</b> DSMZ, Braunschweig	0	1	1	0	0	
<b>gesamt</b>	25	25	25	25	25	

(-)K= Negativkontrolle; **Z1**= Zellüberstand Nr. 1; **NEB**= New England BioLabs Bestellnummern;  
**iK**= ca. 1000 Bp Fragment, das auch von den Primern erkannt wird; **(+)K**= Mykoplasma-DNA;  
 ...= weitere Proben

**Tab. 3.25: Primersequenzen für die Mykoplasmen-PCR**

5' Primer	3' Primer
CGC CTG AGT AGT ACG TWC GC	GCG GTG TGT ACA ARA CCC GA
TGC CTG RGT AGT ACA TTC GC	GCG GTG TGT ACA AAC CCC GA
CRC CTG AGT AGT ATG CTC GC	
CGC CTG GGT AGT ACA TTC GC	

**W**= „A“ oder „T“; **R**= „G“ oder „A“

**Tab. 3.26: PCR-Reaktionszyklus für den Mykoplasmennachweis**

PCR-Schritt	Zeit [Min'/s'']	Temp. [°C]	Zyklen
Initiale Denaturierung	5'	95	1
Denaturierung	1'	95	35
Hybridisierung	1'	65	
Polymerisation	1'30''	72	
Terminale Elongation	5'	72	1

### 3.7.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

In einem Agarosegel können DNA-Fragmente durch Anlegen eines elektrischen Feldes entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Die durch die Phosphatgruppen der Desoxiribose negativ geladenen DNA-Fragmente wandern zum Pluspol. Längere Fragmente werden durch die dreidimensionale Netzstruktur des Gels stärker zurück gehalten und wandern daher langsamer als kürzere Fragmente.

Das auspolymerisierte Agarosegel wird in eine Gelelektrophoresekammer eingebracht und die Kammer wird mit TAE-Puffer (Tab. 3.27) gefüllt bis das Gel gerade eben bedeckt ist. Von den Mykoplasmen-PCR Proben werden jeweils 5 µL mit 1 µL 6fach Ladepuffer (Tab. 3.28) gemischt und auf ein 0,8 % Agarosegel (0,8 % Agarose in TAE-Puffer) aufgetragen. Als Größenstandard werden ebenfalls 5 µL Marker (1 kB DNA ladder Fermentas GeneRuler™ #SM0313) aufgetragen. Entsprechend der Breite des Gels werden 10 V /cm angelegt. Nach dem Auftrennen der Fragmente, was am Laufverhalten des Ladepuffers abgeschätzt werden kann, wird das Gel in ein Ethidiumbromidbad (0,5 µg Ethidiumbromid /mL dH<sub>2</sub>O) transferiert und für 10-15 Min inkubiert. Das Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und kann unter UV-Licht (Transilluminator λ=312 nm) sichtbar gemacht werden. Die vom Gel aufgenommenen Fotos werden mittels Photoshop 7.0, Adobe Systems, in Kontrast und Helligkeit optimiert.

**Tab. 3.27: TAE-Laufpuffer für die Agarosegelelektrophorese (50fach)**

---

242	g	TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)
57,1	mL	Essigsäure
100	mL	0,5 M EDTA, pH 8,0
ad 1000	mL	ddH <sub>2</sub> O
Lagerung bei RT		

---

**Tab. 3.28: Ladepuffer für die Agarosegelelektrophorese**

---

0,25	%	Bromphenolblau
0,25	%	Xylencyanol
1,5	%	Ficoll 400
ad 100	%	ddH <sub>2</sub> O
Lagerung bei -20 °C		

---

### 3.7.2 WACHSTUMSVERSUCHE MIT TRYPANOSOMEN

Während eines Transmigrationsversuches befinden sich die Trypanosomen im Kulturmedium der BHS-Zellen. Um die Frage zu klären, ob trypanosomales Wachstum oder Absterben in diesem Medium die Transmigrationrate beeinflusst, werden Wachstumsversuche in 24-well Platten durchgeführt. Als Ausgangsmaterial werden gut gewachsene Trypanosomenkulturen ausgezählt, auf zwei 50 mL Röhrchen aufgeteilt und bei 500 \*g für 10 Min abzentrifugiert. Ein Teil der Trypanosomen wird in ihrem jeweiligen Kulturmedium (Baltz Complete bzw. HuMEM) resuspendiert, der andere Teil in BHS-Medium (Quantum 286). Das Resuspensionsvolumen wird so gewählt, dass sich eine Zellzahl von  $3,3 \cdot 10^6$  Trypanosomen /mL ergibt. Jeweils 100 µL dieser Zellsuspensionen werden für den Wachstumsversuch eingesetzt (Tab. 3.29). In einer weiteren Versuchsreihe, wird Quantum 286 zusätzlich mit 10 % FCS versetzt. Nach 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 und 48 h wird die Zellzahl bestimmt.

**Tab. 3.29: Ansatz des Trypanosomen-Wachstumsversuchs**

	<b>Kontrolle</b> [µL]	<b>Medium 1</b> [µL]	<b>Medium 2</b> [µL]
<b><math>3,3 \cdot 10^6</math> T /mL in TM</b>	100	-	-
<b><math>3,3 \cdot 10^6</math> T /mL in Q286</b>	-	100	100
<b>FCS</b>	-	-	100
<b>Kulturmedium</b>	900 (TM)	900 (Q286)	800 (Q286)

T= Trypanosomen; **TM**= Trypanosomales Kulturmedium; **Q286**= Quantum 286

### 3.7.3 KOKULTUR VON TRYPANOSOMEN UND ZELLEN

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die gleichzeitige Transmigration (Kotransmigration) von TC221-Trypanosomen und J774-Makrophagen untersucht. Für diesen Versuch ist es notwendig zu wissen, ob die Makrophagen einen trypanoziden Effekt haben.

Ausgehend von gut gewachsenen Vorkulturen von TC221-Trypanosomen und J774-Makrophagen werden Kokulturen angelegt. Hierfür werden die Trypanosomen auf zwei 50 mL Röhrchen aufgeteilt und bei 500 \*g für 10 Min abzentrifugiert. Ein Teil der Trypanosomen wird in ihrem Kulturmedium resuspendiert, der andere Teil in J774-Kulturmedium. Das Resuspensionsvolumen wird so gewählt, dass sich eine Zellzahl von  $2,0 \cdot 10^6$  Trypanosomen /mL ergibt. Die Makrophagen werden mittels Zellschaber vollständig in Suspension gebracht und bei 100 \*g für 5 Min abzentrifugiert. Das Pellet wird in einem

entsprechend großen Volumen resuspendiert, so dass sich eine Zellzahl von  $5 \cdot 10^6$  Zellen /mL ergibt. Jeweils 500  $\mu\text{L}$  der jeweiligen Zellsuspensionen werden für die Kokultur in 25  $\text{cm}^2$  Zellkulturflaschen eingesetzt und mit 4,5 mL J774-Kulturmedium gut vermischt. Die Zellzahlen werden nach 0, 24, 48 und 72 h bestimmt.

**Tab. 3.30: Ansatz der Kokultur von Trypanosomen und Makrophagen**

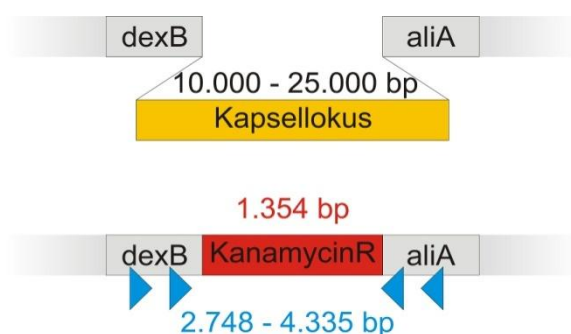
	Kontrolle T [ $\mu\text{L}$ ]	Kontrolle M $\Phi$ [ $\mu\text{L}$ ]	Kokultur [ $\mu\text{L}$ ]
<b><math>2 \cdot 10^6</math> T /mL in TM</b>	500	-	-
<b><math>2 \cdot 10^6</math> T /mL in M<math>\Phi</math>-M</b>	-	-	500
<b><math>5 \cdot 10^6</math> M<math>\Phi</math> /mL in M<math>\Phi</math>-M</b>	-	500	500
<b>Kulturmedium</b>	4500 (TM)	4500 (M $\Phi$ -M)	4000 (M $\Phi$ -M)

T= Trypanosomen; M $\Phi$ = Makrophagen; M $\Phi$ -M= Makrophagenmedium

### 3.8 KAPSELMUTAGENESE BEI PNEUMOKOKKEN

Die Kapsel der Pneumokokken entscheidet *in vivo* über die Fähigkeit, eine Erkrankung auszulösen und *in vitro* beeinflusst sie die Adhäsion an Zellen. Vergleicht man klinische Isolate mit bekanntem Krankheitsverlauf im Transwellversuch, so liefern Kapselmutanten dieser Isolate Erkenntnisse über den Beitrag der Kapsel zur Virulenz eines Stammes.

Die natürliche Fähigkeit der Pneumokokken zur Aufnahme exogener DNA und deren Integration über homologe Rekombination in Genom wird ausgenutzt, um den



**Abb. 3.3:** Schematische Darstellung des Kapsellokus und der Kanamycinkassette

**Oben:** bei allen Serogruppen ist der Kapsellokus (gelb) flankiert von den Genen *dexB* und *aliA*. **Unten:** Durch homologe Rekombination wird der Kapsellokus durch ein Kanamycinresistenzgen (rot) ersetzt. Durch zwei Primerpaare (blaue Pfeile) kann die KanR-Kassette amplifiziert werden. Es entstehen je nach Primerkombination Fragmente zwischen 2,7 und 4,3 kb.

Kapselgenlokus durch eine Kanamycinkassette zu ersetzen. Das Gen, das die Kanamycinresistenz vermittelt, ist flankiert von Teilsequenzen der Gene *aliA* im Upstreambereich sowie *dexB* im Downstreambereich (Pearce *et al.*, 2002) (**Abb.**

**3.3**). Diese beiden Gene flankieren stets den Kapsellokus (Bentley *et al.*, 2006) und dienen als homologe Bereiche für das Rekombinationsereignis. Kapselmutanten wachsen auf kanamycinhaltigen Agarplatten und zeigen einen rauen Koloniephänotyp.



Mittels Southernblott Analyse wird die Integration der Kanamycinkassette auf DNA-Ebene nachgewiesen.

### 3.8.1 ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS PNEUMOKOKKEN

Die für die Transformation benötigte Kanamycinkassette wird aus dem Genom von Laborstämmen mit einer bereits deletierten Kapsel („TIGR4“  $\Delta$ cps, „D39“  $\Delta$ cps) amplifiziert. Hierfür wird die genomische DNA aus Pneumokokken mittels der CTAB-Methoden gewonnen. CTAB oder Cetyltrimethylammoniumbromid dient hierbei als Detergenz. Die benötigten Reagenzien sind in Tab. 3.31 aufgelistet.

**Tab. 3.31: Reagenzien für die DNA-Isolierung**

Reagenz	Zusammensetzung	Quelle
10 % SDS-Lösung	10 % SDS in dH <sub>2</sub> O	Fa. Roth CN30.2
70 % EtOH-Lösung	70 % Ethanol (vergällt) in dH <sub>2</sub> O	
Chloroform/ Isomaylalkohol	24:1	Fa. Roth X984.3
CTAB-NaCl Lösung	siehe Tab. 3.33	
Isopropanol	reinst	Fa. Roth CP41.1
Lysepuffer	Tab. 3.32	
NaCl-Lösung	5 M in dH <sub>2</sub> O	
Phenol/Chloroform/ Isomaylalkohol	25:24:1	Fa. Roth A156.3
TRIS-Puffer	siehe Tab. 3.34	

**Tab. 3.32: Lysepuffer**

555 $\mu$ L	PBS	(Tab. 3.8)
30 $\mu$ L	10 % SDS	
5 $\mu$ L	Lysozym (20 mg/ mL in dH <sub>2</sub> O)	
5 $\mu$ L	Mutanolysin (5000 U /mL in TRIS-Puffer)	
5 $\mu$ L	Pronase (20 mg /mL in dH <sub>2</sub> O)	
Gut mischen		

**Tab. 3.33: CTAB-Lösung**

---

4,1	g	NaCl	
80	mL	dH <sub>2</sub> O	
		lösen	
10	g	CTAB	Fa. Roth 9161.1
		lösen unter Rühren bei 65 °C	
ad 100	mL	dH <sub>2</sub> O	
		Lagerung bei RT	

---

**Tab. 3.34: TRIS-Puffer (10 mM, pH 8)**

---

12,1	mg	TRIS	Fa. Roth 4855.1
ad 1000	mL	dH <sub>2</sub> O	
		mit HCl auf pH 8,0 einstellen	

---

Die Pneumokokkenstämme werden am Vortag morgens auf Blutagar ausgestrichen und abends auf eine neue Blutagarplatte überimpft. Die Platten werden üN im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen werden die Pneumokokken von den Platten abgenommen und in je 8 mL THY (Tab. 3.10) mit je OD<sub>600 nm</sub> = 0,12 angeimpft. Die Stämme werden bis OD<sub>600 nm</sub> = 0,4 kultiviert und danach werden je 1,5 mL Kultur in 2 mL Reaktionsgefäßen bei 1000 \*g für 10 Min abzentrifugiert. Das Pellet wird in 600 µL Lysepuffer resuspendiert und mindestens 1 h im Heizblock bei 37 °C inkubiert. Die Dauer und die Temperatur (bis 50 °C) können erhöht werden, bis die Lösung klar wird. Anschließend werden 100 µL 5 M NaCl-Lösung zugegeben und gut vermischt. Je 80 µL der auf 65 °C vorgewärmten CTAB-Lösung werden hinzugegeben. Die Reaktionsgefäße werden vorsichtig mehrmals invertiert und bei 65 °C für 10 Min inkubiert. Sodann werden 700 µL Chloroform /Isoamylalkohol zugegeben und es wird vorsicht gemischt. Nach einer Zentrifugation bei 6000 \*g für 5 Min wird der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und es werden 700 µL Phenol /Chloroform /Isoamylalkohol zugegeben. Die Gefäße werden mehrere Male vorsichtig invertiert und das Gemisch wird erneut abzentrifugiert. Der wässrige Überstand wird in ein neues Gefäß überführt und mit 2/3 Volumen Isopropanol zur DNA-Fällung vermischt. Nach

5 Min bei RT wird das Gemisch bei maximaler Beschleunigung für 15 Min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird in 70 % EtOH gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (max. \*g; 15 Min) wird der Überstand verworfen, das Pellet wird bei RT kurz getrocknet und schließlich in 70-100 µL TRIS-Puffer resuspendiert (üN bei 4 °C). Zur Kontrolle der isolierten DNA wird die Konzentration und Reinheit mit Hilfe des Nanodrops bestimmt und der Fragmentationsgrad der DNA wird mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

### 3.8.2 AMPLIFIKATION DER KANAMYCINKASSETTE

Mit einer PCR und einem Set spezifischer Primer wird die Kanamycinkassette aus der genomischen DNA kapsellokusdeletierter Laborstämme amplifiziert. Die Primersequenzen sind in Tab. 3.35 aufgelistet und das entsprechende PCR-Programm in Tab. 3.36. Da nicht bekannt ist, welche Primerkombination die besten Amplifikationsergebnisse ergibt, werden die zwei Forwardprimer (F1, F2) jeweils mit den beiden Reverseprimern (R1, R2) kombiniert, Hieraus ergeben sich vier verschiedene Kombinationen mit jeweils vier leicht unterschiedlichen Sequenzlängen. Bei erfolgreicher Amplifikation können alle für die Transformation eingesetzt werden.

**Tab. 3.35: Primersequenzen für die Kapselmutagenese /-detektion**

Oligobezeichnung	Sequenz (5'-3')
SBdexBF1	GGA TGA TAA TGG CTA TGA TAT TGC
SBdexBF2	GAA TCA GGC GAC CTT TGG AG
SBaliAR1	CAT AGG CAT CCA ACC CTT TGA TTG
SBaliAR2	CAA GGT AGG TTG ATG GAT CGG C
SBdex19Frevers	GCT CTC GTC CCA TTG CAT AGG

**Tab. 3.36: PCR-Reaktionszyklus für die Kapselmutagenese**

PCR-Schritt	Zeit [Min'/s'']	Temp. [°C]	Zyklen
Initiale Denaturierung	7'	95	1
Denaturierung	45''	94	35
Hybridisierung	45''	60	
Polymerisation	4'	72	
Terminale Elongation	5'	72	1

Nach der PCR werden die Proben vollständig auf ein Agarosegel aufgetragen und per Gelelektrophorese aufgetrennt (analog zu 3.7.1.2). Die Banden werden mit dem Lonza Gelstar DNA Stain angefärbt und auf einem Blauschirm ausgeschnitten. Um die Banden deutlich zu erkennen, muss eine speziell braungetönte Brille getragen werden. Die Kanamycinkassette wird nun aus dem Gel eluiert und aufgereinigt (Quigen QIAquick Gel Extraction Kit, Protokoll siehe 6.2.3 im Anhang S. 174). Zur Kontrolle der isolierten Kanamycinkassette wird die Konzentration und Reinheit mit Hilfe des Nanodrops bestimmt. Zusätzlich wird die Aufreinigung mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

### 3.8.3 TRANSFORMATION

Die klinischen Isolate der Pneumokokken werden mit der amplifizierte Kanamycinkassette transformiert. Das Prinzip der Transformation beruht auf der Induktion der natürlichen Kompetenz der Pneumokokken durch CSPs (competence stimulating peptides).

Für die Transformation wird frisches THY-Medium (Tab. 3.10) mit pH 8 benötigt. Die CSPs werden in dH<sub>2</sub>O gelöst mit einer Konzentration von 10 µg/ mL und bei -20 °C gelagert. Die zu transformierenden SPN-Stämme werden am Vortag morgens auf Blutagar ausgestrichen und abends auf eine neue Blutagarplatte überimpft. Die Platten werden üN im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen werden die Pneumokokken von den Platten abgenommen und in je 8 mL THY (Tab. 3.10) mit je OD<sub>600 nm</sub> = 0,04 angeimpft. Die Stämme werden bis OD<sub>600 nm</sub> = 0,1 kultiviert. Zur Kompetenzinduktion werden so dann 1-5 µL CSP1 oder CSP2 zugegeben und die Kulturen werden für weitere 20 Min bei im Brutschrank inkubiert. Währenddessen werden 1,5 mL Reaktionsgefäße mit der zu transformierenden DNA (Kanamycinkassette) bestückt (1-10 µL PCR-Produkt) und auf Eis gestellt. Die Kulturen werden aus dem Brutschrank auf Eis transferiert und darin 4 Min gelagert. Danach werden je

250 µL der Kultur in ein Reaktionsgefäß mit DNA gegeben und bei 30 °C inkubiert (Thermoblock). Nach Ablauf von 30 Min werden die Gefäße für weitere 90 Min bei 37 °C inkubiert. Währenddessen werden Blutagarplatten mit Antibiotika versehen. Anfangs wurden 50 µL Kanamycin und 100 µL 1fachem PBS, in den meisten Versuchen jedoch 50 µL Kanamycin und 50 µL Neomycin mit 100 µL 1fachem PBS vermischt und mit einem Drigalskispatel sorgfältig auf der Blutagarplatte verteilt. Da klinische Isolate zum Teil unempfindlicher als die Laborstämme gegenüber Kanamycin sein können, kann für die Selektion auf Transformanten eine höhere Kanamycinkonzentration hilfreich sein. Weiterhin verleiht das Kanamycinresistenzgen auch Resistenz gegenüber Neomycin, so dass ein Kanamycin-Neomycingemisch verwendet werden kann. Die Platten verbleiben für 15-20 Min mit geöffnetem Deckel unter der Sterilwerkbank, damit sie antrocknen können. Schließlich wird der gesamte 250 µL Transformationsansatz auf einer Platte ausplattiert. Dabei ist unbedingt darauf zu achten, dass der Drigalskispatel auch wirklich nach dem Abflammen abgekühlt ist. Die Platten werden üN im Brutschrank inkubiert.

Potentiell positive Transformanten wachsen im zentralen Bereich der antibiotikahaltigen Blutagarplatten und zeigen einen „rauen“ Koloniephänotyp. Als weitere Kontrollen werden folgende Experimente durchgeführt. Mittels PCR und den spezifischen Primern wird die Kanamycinkassette amplifiziert. Die Transformanten werden in einem Wachstumsversuch in Flüssigmedium mit und ohne Antibiotikum (20 µL Kanamycin + 20 µL Neomycin in 20 mL THY) angezogen. Schließlich wird die Insertion der Kanamycinkassette im Genom durch Southern Blot nachgewiesen.

### **3.8.4 SOUTHERN BLOT**

Das Southern Blot (Southern, 2006) Verfahren ermöglicht den Nachweis bestimmter DNA-Sequenzen im isolierten Genom eines Organismus. In dieser Arbeit wird das Verfahren angewandt, um auf genomischer Ebene die Insertion der Kanamycinkassette in das Genom klinischer Pneumokokkenisolate und damit die Kapsellokusdeletion nachzuweisen. Zu diesem Zweck wird die genomische DNA aus der potentiellen Kapselmutante isoliert (3.8.1) und einem Restriktionsverdau mit *HindIII* (NEB, 20.000 units; #R01045) unterzogen. Die daraus entstehenden Fragmente werden gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.7.1.2) und im Kapillarblotverfahren auf eine Nylonmembran transferiert (Southern Blot). Der Nachweis der Kanamycinkassette erfolgt mittels einer Digoxigenin (DIG) markierten DNA-Sonde. Das

Digoxigenin dient als Antigen für einen mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelten Antikörper. Das Enzym katalysiert eine chemische Reaktion, die zu einem lilafarbenem Farbstoffniederschlag führt und die Bande sichtbar macht.

#### 3.8.4.1 Herstellung der Sonde

Die Herstellung der Sonde erfolgt in einer PCR, in der DIG-markierte und unmarkierte dNTPs eingesetzt werden. Das PCR-Programm zeigt Tab. 3.37 und das Pipettierschema ist in Tab. 3.38 wiedergegeben. Die Primersequenzen sind in Kapitel 3.8.2, Tab. 3.35 aufgelistet.

**Tab. 3.37: PCR-Reaktionszyklus für DIG-Sondenherstellung**

PCR-Schritt	Zeit [Min'/s'']	Temp. [°C]	Zyklen
Initiale Denaturierung	7'	95	1
Denaturierung	45''	94	35
Hybridisierung	45''	60	
Polymerisation	4'	72	
Terminale Elongation	5'	72	1

**Tab. 3.38: Pipettierschema für die DIG-Sonden PCR**

	DIG dNTP	K+	H <sub>2</sub> O
<b>dNTPs (2 mM)</b> Biolabs #N447S	5	0,4	0,4
<b>DIG dUTP (1 mM/ µL)</b> Roche #11558706910	3,5	0	0
<b>SBdexBF2 (0,1 mM)</b>	1,25	0,5	0,5
<b>SBdex19Frevers (0,1mM)</b>	1,25	0,5	0,5
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	28,5	14,4	16,4
<b>PCR-Puffer (10fach)</b> NEB #B9004S	5	2	2
<b>TaqPol</b> NEB #M0203S	0,5	0,2	0,2
<b>Probe gDNA</b>	5	2	0
<b>gesamt</b>	50	20	20

H<sub>2</sub>O= Negativkontrolle; K+ = Positivkontrolle; NEB= New England BioLabs Bestellnummern; gDNA = genomische DNA

Im Anschluss an die PCR wird die DIG-Sonde mit dem illustra Micro Spin™ G-50 Columns Kit (GE Healthcare) aufgereinigt. Die Säulen werden äquilibriert und bei 1500 \*g für 2 Min abzentrifugiert. Anschließend werden 50 µL des PCR-Produkts auf die Säulen gegeben und bei 1500 \*g für 4 Min zentrifugiert. Nach der Aufreinigung wird das Vorhandensein der Sonde in einer Agarosegelelektrophorese (3.7.1.2) mit einem 1,5 %igem Gel überprüft. Zusätzlich wird die Positivkontrolle aus der PCR mit aufgetragen.

#### 3.8.4.2 Restriktionsverdau

Genomische DNA wird aus den klinischen Isolaten und deren Kapselmutanten, sowie zur Kontrolle aus den Stämmen „SPN D39“ und „SPN D39“ Δcps isoliert (3.8.1). Die gewonnene DNA wird üN mit dem Restriktionsenzym *HindIII* bei 37 °C im Brutschrank verdaut. Der Verdau erfolgt in einem 20 µL Ansatz: Es werden 5 µg DNA /µL vorgelegt, jeweils 1 µL *HindIII* und jeweils 2 µL 10fach Reaktionspuffer (NEB buffer 2) werden zugegeben und mit dH<sub>2</sub>O auf 20 µL aufgefüllt. Am nächsten Tag wird der gesamte Ansatz in einem 1,5 %igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Bei einem Gel mit der Kantenlänge 15 cm lässt man es für ca. 2,5 h bei 70 V laufen. Im Anschluss wird das Gel für 15 Min im Ethidiumbromidbad angefärbt und anschließend unter UV-Licht abfotografiert.

#### 3.8.4.3 Blotverfahren

Das Agarosegel wird einer Vorbehandlung unterzogen bevor es geblottet wird. Im ersten Schritt wird das Gel für 15 Min in 0,25 M HCl bei 160 rpm auf dem Schüttler depuriniert und mit MilliQ-Wasser gewaschen. Im zweiten Schritt wird es für 15 Min in 1,5 M NaCl und 0,5 M NaOH bei 160 rpm auf dem Schüttler denaturiert und erneut in MilliQ-Wasser gewaschen. Im dritten Schritt wird das Gel für 15 Min in 1,5 M NaCl und 0,5 M TRIS/HCl bei pH 7 neutralisiert. Schließlich wird es im letzten Schritt für 5 Min in 20fachem SSC-Puffer (Tab. 3.39) bei 160 rpm auf dem Schüttler äquilibriert.

**Tab. 3.39: 20fach SSC-Puffer**

---

175,32	g	NaCl (3 M)
88,23	g	Tri-Natriumcitrat Dihydrat (0,3 M)
ad 1000	mL	dH <sub>2</sub> O
		pH einstellen mit HCl auf 7,0
		autoklavieren

---

Der Blot wird standardmäßig aufgebaut. Innerhalb einer Plastikschaale wird eine Erhöhung mit einer Glasplatte errichtet und mit einem Stück Whatmanpapier derart belegt, dass das Papier an zwei Seiten in 20fachem SSC-Puffer hängt, welcher sich in der Schale befindet. Auf dieses Stück Whatmanpapier wird das Gel aufgelegt und freie Stellen des Papiers werden mit Parafilmstreifen abgedichtet. Eine Nylonmembran in der Größe des Gels (15\*17 cm), die in 20fachem SSC-Puffer äquilibriert wurde, wird durch das Abschneiden einer kleinen Ecke markiert und auf das Gel aufgelegt. Auf diese Membran werden drei Schichten Whatmanpapier in der Größe 15\*17 cm gelegt. Auf das Whatmanpapier wird ein 6 cm hoher Stapel aus 15,5\*17,5 cm großen Papiertüchern aufgeschichtet. Der gesamte Stapel wird mit einer Glasplatte abgedeckt und mit einem 800 g schweren Gewicht beschwert. Durch den Sog des Puffers begünstigt durch die positive Ladung der Membran wird die negativ geladene DNA in den Puffer aus dem Gel auf die Membran transferiert. Am nächsten Tag wird die Nylonmembran auf SSC-Puffer feuchtes Whatmanpapier im UV-Crosslinker für zwei Durchgänge behandelt. Durch das UV-Licht werden die DNA-Stränge mit der Membran quervernetzt. Danach wird die Membran in 5fachem SSC-Puffer gewaschen.

#### 3.8.4.4 Hybridisierung und Detektion

Für die Hybridisierung wird die Membran in einen Glaskolben transferiert. Die Hybridisierungstemperatur wird nach folgender Formel berechnet:

$$T_{\text{Hybridisierung}} = ((49,82 + (0,41 * [\% \text{ G+C}]) - 600/L) - (20 \text{ bis } 25 \text{ }^{\circ}\text{C}))$$

**Abb. 3.4:** Berechnung der Hybridisierungstemperatur (Roche Kit)

Für die Sondenhybridisierung und Detektion wird das Roche DIG Nucleic Acid Detection Kit verwendet. Der Blot wird zunächst in 5 mL Hybridisierungslösung (3,5 mL DIG Easy /100 cm<sup>2</sup>) bei 42 °C in der Blotrotisserie für 30-60 Min geblockt. Währenddessen wird die Sonde (25 µL /kleiner Blot) für 5 Min bei 95 °C denaturiert und auf Eis transferiert. Von der Hybridisierungslösung wird 1 mL auf 42 °C erwärmt und 25 µL der Sonde werden hinzugegeben. Die Sondenhybridisierungslösung wird gut gemischt und auf den Blot gegeben. Die Hybridisierung erfolgt in der Blotrotisserie bei 42 °C. Am nächsten Tag wird der Blot zuerst zweimal für 5 Min in 2fachem SSC-Puffer mit 0,1 % SDS bei RT und danach zweimal für 15 Min in 0,1fachem SSC-Puffer mit 0,1 % SDS bei 68 °C gewaschen. Für die



Detektion werden die in Tab. 3.40 aufgelisteten Lösungen verwendet. Der Blot wird in Waschpuffer gespült und sodann zweimal für 30 Min mit 25 mL Blockierlösung behandelt. Im nächsten Schritt werden 10 mL der AP-Antikörperlösung zugegeben. Nach der Antikörperinkubation für 30 Min bei RT wird der Blot zweimal in 25 mL Waschpuffer gewaschen. Im nächsten Schritt werden für 2-5 Min 20 mL Detektionspuffer auf den Blot gegeben und anschließend wird der Blot in 10 mL Detektionslösung entwickelt. Sobald die Banden gut sichtbar sind, wird die Reaktion durch sanftes Spülen in TE-Puffer oder MilliQ-Wasser abgestoppt. Das Reaktionsprinzip beruht darauf, dass die alkalische Phosphatase das Phosphat des Substrats 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP) abspaltet. Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT) oxidiert das Produkt weiter und ist in seiner reduzierten Form selbst blaufarben, sodass die Detektion sensibler wird. Es entsteht ein lilafarbener unlöslicher Niederschlag, der die Bande kennzeichnet. Der Blot wird eingescannt und als monochromes jpg-Bild abgespeichert.

**Tab. 3.40: Lösungen für die Southern Blot Detektion**

<b>Waschpuffer</b>			
1	M	Maleinsäure	
1,5	M	NaCl	
3	%	Tween	
Auf pH 7,5 einstellen			
<b>Blockierlösung</b>			
1	M	Maleinsäure	
10	%	Blockingreagenz	Roche Kit
<b>AP-AK Lösung</b>			
		AK bei 9500 *g abzentrifugieren	Roche Kit #3
2	µL	Antidigoxigenin-AP-AK (aus Überstand)	
ad 10	mL	Blockinglösung	
<b>Detektionspuffer</b>			
0,1	M	TRIS /HCl	
0,1	M	NaCl	
Auf pH 9,5 einstellen			
<b>Detektionslösung</b>			
200	µL	NBT /BCIP	Roche Kit #4
ad 10	mL	Detektionspuffer	

**AP**= Alkalische Phosphatase; **AK**= Antikörper; **Kit**=Roche DIG Nucleic Acid Detection Kit

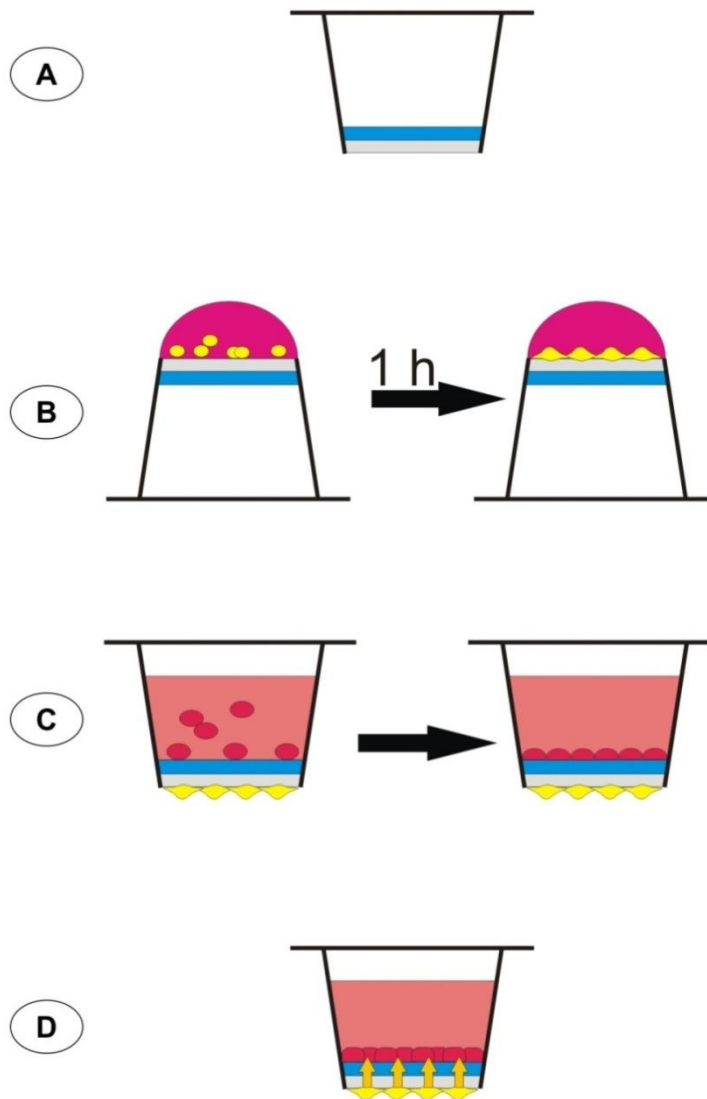
### 3.9 BLUT-HIRNSCHRANKE MODELLSYSTEME

Die in dieser Arbeit verwendeten *in vitro* BHS-Modellsysteme sind transwellbasiert, das bedeutet, dass die Zellen in und /oder auf einem Einsatz kultiviert werden, der in einer Vertiefung einer 24-well Platte eingehängt wird. Der Boden des Transwelleinsatzes besteht aus einer Membran mit definierter Porengröße und kann auf der Innenseite mit Matrigel beschichtet sein. Matrigel besteht laut Herstellerangaben aus den Hauptkomponenten Laminin (56 %), Kollagen IV (31 %), Entactin (8 %) und Heparansulfat Proteoglykanen als gelierende Matrix. Da Matrigel aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maussarkomen isoliert wird, enthält es auch Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta$ , bFGF, EGF, IGF-1, PDGF, NGF), die natürlicherweise in diesem Sarkom vorkommen (Becton&Dickinson, 2011).

#### 3.9.1 DAS ECV304-C6 MODELL

Das ECV304-C6 BHS-Modell besteht aus zwei Zelllinien. Die humane Zelllinie ECV304 hat Endotheleigenschaften und wird innerhalb des Transwelleinsatzes auf Matrigel kultiviert. Bei den C6-Zellen handelt es sich um eine Gliazelllinie aus einem Gliom der Ratte. Die C6-Zellen werden auf der Unterseite des Transwelleinsatzes kultiviert.

Für die Beschichtung der Unterseite der Transwelleinsätze mit C6-Zellen wird eine Inkubationskammer benötigt, die gute Bedingungen für die Zelladhärenz bietet. Diese Kammer wird aus zwei 12-well Platten hergestellt, in dem die eine 12-well Platte kopfüber auf die andere gestellt wird. Die Deckel der Platten werden nicht benötigt. Beide Platten werden an der hinteren Längsseite mit einem Streifen Klebeband verbunden, so dass ein Klappmechanismus entsteht. Auf diese Weise erhält man zwölf Kammern, in die man 24-well Einsätze mit der Oberseite nach unten stellen kann, so dass die Membranseite nach oben zeigt. Jede 12-well Kammer wird mit 1 mL Medium befüllt, so dass sich bei geschlossenem Deckel genug Luftfeuchtigkeit in der Kammer einstellen kann, die Verdunstungsprozesse verhindert. Die C6-Zellen werden aus einer gut bewachsenen 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche mittels Trypsin-EDTA abgeerntet. Dabei wird das Trypsin sofort abgesaugt, sobald sich die ersten Zellen vom Flaschenboden lösen. Dieser Prozess beginnt meist vom Rand der Flasche aus. Mit 5 mL Ham's F12-Medium wird der Zellrasen sorgsam vom Flaschenboden gespült. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wird eine Vereinzellung der Zellen gewährleistet. Für die Zellzahlbestimmung wird eine 1:10 Verdünnung hergestellt. Für das Aussähen der Zellen wird die Konzentration auf  $7,14 \cdot 10^5$  Zellen /mL eingestellt und 70  $\mu$ L ( $5 \cdot 10^4$  Zellen) dieser



**Abb. 3.5:** Schema zum Erstellen der optimierten ECV304-C6 BHS

Als Kulturgefäß dienen Transwelleinsätze mit einer 8 µm Poren-Membran (grau), die mit Matrigel (blau) beschichtet sind (**A**). Auf die Unterseite werden C6-Astrozyten (gelb) in Ham's F12 pipettiert, die nach 1 h adhären sind (**B**). In das Innere der Einsätze werden ECV304-Zellen (rot) in Quantum 286 ausgesät (**C**). Innerhalb einer fünftägigen Inkubationszeit bilden sie eine konfluente Zellschicht aus (**D**). Durch Induktionsvorgänge ausgehend von den Astrozyten (**gelbe Pfeile**) entstehen in den ECV304-Zellen dichte Zell-Zellverbindungen. Aus (Untucht, 2007).

Zellsuspension werden auf die Membranunterseite der Transwelleinsätze pipettiert (**Abb. 3.5**). Die Transwelleinsätze werden nun bei geschlossener Inkubationskammer für 1 h bei RT unter der Sterilwerkbank inkubiert. In dieser Zeit muss sichergestellt werden, dass keine Erschütterungen den Adhärenzprozess beeinflussen und ein seitliches Abfließen des Tropfens verhindert wird. Nachdem die C6-Zellen adhären geworden sind, wird der Tropfen vorsichtig abgeschüttelt und die Transwelleinsätze werden in eine 24-well „Companion“-Platte überführt, in die pro Vertiefung 800 µL Medium vorgelegt wurde. Diese Platten sind so

konstruiert, dass die Einsätze exakt mittig eingehängt werden und nicht verrutschen können. In die Transwelleinsätze wird jeweils 500 µL Medium gegeben und die Platte wird für 2 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Laut Herstellerangaben muss das Matrigel mindestens zwei Stunden rehydriert werden, da es gefriergetrocknet geliefert wird. Kurz vor Ablauf der Rehydratationszeit wird eine gut bewachsene 75 cm<sup>2</sup> Flasche mit ECV304-Zellen abtrypsinisiert und die Zellzahl der Suspension wird auf  $2 \cdot 10^5$  Zellen /mL eingestellt. Die Transwelleinsätze werden durch vorsichtiges Abkippen entleert und in eine neue Vertiefung mit frischen 800 µL Medium überführt. In jeden Einsatz werden sodann 300 µL ( $6 \cdot 10^4$  Zellen) der ECV304-Zellsuspension gegeben (**Abb. 3.5**). Die Platte mit den BHS-Einsätzen wird für fünf Tage im Brutschrank inkubiert. Werden die BHS-Einsätze in M199-Medium kultiviert, erfolgt ein Mediumwechsel am vierten Tag. Das Medium wird in beiden Kompartimenten, also sowohl innerhalb des Einsatzes als auch in der 24-well Kammer, durchgeführt. Vorsichtiges und langsames Pipettieren verhindert die Beschädigung der ECV304-Zellschicht. Ein Mediumwechsel ist bei Verwendung des serumfreien Quantum 286 Mediums nicht notwendig.

### **3.9.2 DAS INVERSE ECV304-C6 BHS-MODELL**

Um eine Transmigrationsroute vom ZNS in die Blutbahn zu simulieren, also eine inverse Blut-Hirnschranke (BHSi), werden die Positionen der ECV304 und C6-Zellen im Modell vertauscht. Dies bedeutet, dass zunächst  $5 \cdot 10^4$  ECV304-Zellen auf die Unterseite der Transwelleinsätze aufgebracht werden und dass innerhalb der Einsätze  $6 \cdot 10^4$  C6-Zellen ausgesät werden. Ausgenommen dieser Veränderungen wird das inverse BHS-Modell analog zum ursprünglichen ECV304-C6 BHS-Modell aufgebaut.

### **3.9.3 DAS HBMEC-MODELL**

Das HBMEC BHS-Modell wird etabliert, um die Transmigration von Streptokokken an einem weiteren Modell zu testen und mit dem ECV304-C6 Modell zu vergleichen. Für die Evaluierung werden verschiedene Parameter variiert und die Permeabilität wird anhand der Transmigration von *E. coli* HB101 bewertet. Neben unterschiedlichen HBMEC-Inokuli ( $2, 6, 9 \cdot 10^4$  Zellen pro Transwelleinsatz) werden auch die Beschichtung der Transwelleinsätze und die Kulturdauer variiert. Als Alternative zur Matrigelbeschichtung wurden Transwellassays mit 3,0 µm Membranporengröße mit Gelatine beschichtet und unbeschichtet verwendet. Des Weiteren wurden HBMEC mit C6-Zellen als BHS-Modell analog zum ECV304-C6 Modell

kokultiviert. Die Konzentration der C6-Zellen wird nicht variiert. Analog zum ECV304-C6 Modell werden  $5 \cdot 10^4$  Zellen pro Einsatz ausgesät. Die Kulturdauer beträgt drei oder fünf Tage. Auf einen Mediumwechsel wird verzichtet.

#### 3.9.3.1 Gelatinebeschichtung von Transwelleinsätzen

Für die Beschichtung wird eine 1 %ige Gelatinelösung hergestellt. Hierfür werden 1 g Gelatine (Gelatine Gold, 180 Blom) in 100 mL MilliQ-Wasser gelöst und autoklaviert. Die zu beschichtenden Einsätze werden in eine 24-well Platte ohne Medium überführt und 100  $\mu$ L der Gelatinelösung wird in jeden Einsatz gegeben. Der Ansatz wird für 30 Min im Brutschrank inkubiert. Anschließend werden 250  $\mu$ L einer frisch hergestellten und sterilfiltrierten 0,5 %igen GA-Lösung (Glutaraldehyd, 25 %ige Stammlösung in MilliQ-Wasser verdünnt) zugegeben. Nach 25 Min bei RT wird der Überstand vorsichtig aus den Einsätzen abgesaugt. Im nächsten Schritt werden die Einsätze von beiden Seiten zunächst mit 1fachem PBS und dann drei Mal mit Zellkulturmedium für 5 Min inkubiert und gespült. In die Gelatine-Einsätze werden im nächsten Schritt Zellen ausgesät. Um eine GA-Vergiftung durch nicht ausreichendes Spülen auszuschließen, wird das Wachstum der Zellen täglich kontrolliert.

### **3.10 TRANSMIGRATIONSVERSUCHE AN BHS-MODELLEN**

Bei Transmigrationsversuchen wird eine definierte Menge an potentiellen Transmigranten in Infektionsmedium resuspendiert und in den Einsatz des Transwellsystems appliziert. Nach einer bestimmten Zeit wird die Anzahl der transmigrierten Bakterien oder Zellen in der unteren Kammer bestimmt.

#### **3.10.1 E. COLI UND STREPTOKOKKEN**

##### 3.10.1.1 E. coli HB101 und K1

Die *E. coli* Bakterien werden am Abend vorher auf eine LB-Agarplatte flächig ausgestrichen und üN im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wird der Bakterienrasen mit einer ausgeglühten Impföse abgenommen und in 1fachem PBS resuspendiert. Anhand einer  $OD_{550\text{ nm}}$ -Messung wird die Zellzahl abgeschätzt (Tab. 3.9). Durch Verdünnen in Infektionsmedium wurden Inokuli zwischen  $1,0 \cdot 10^5$  und  $1,0 \cdot 10^7$  pro BHS-Einsatz eingestellt. Von der Zellsuspension werden je 300  $\mu$ L inokuliert und die BHS-Einsätze werden im

Brutschrank für 5, 6, 8, und 10 h inkubiert. Zur Kontrolle des Inokulums wird eine Verdünnungsreihe in PBS angelegt und auf LB-Agar ausplattiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die BHS-Einsätze entnommen und aus dem Medium der unteren Kammer werden Verdünnungsreihen in einer 96-well Platten erstellt. Mit einer 12-Kanal Multikanalpipette werden gleichzeitig zwölf Proben auf eine viereckige angetrocknete LB-Agarplatte aufgebracht. Durch Schräghalten der Platten laufen die zwölf Tropfen parallel bis zum unteren Rand. Kurz bevor sie diesen erreichen, kippt man die Platte um 90 ° und lässt die Tropfen zurücklaufen. Dabei zieht die Flüssigkeit in den Agar ein. Die Platten werden üN im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag werden die Kolonien ausgezählt.

#### 3.10.1.2 Streptokokken

Für Transmigrationversuche werden Streptokokken in der frühen exponentiellen Wachstumsphase von  $OD_{600\text{ nm}} = 0,3-0,4$  verwendet. *S. agalactiae* wird am Vortag abends frisch auf Blutagar ausgestrichen. *S. pneumoniae* wird am Vortrag morgens frisch ausgestrichen und abends auf frische Blutagarplatten überimpft. Am nächsten Tag wird der Streptokokkenrasen mit einer Impföse von der Platte abgenommen und in THY resuspendiert. Mittels einer photometrischen Messung wird die Zellzahl in 20 mL THY auf  $OD_{600\text{ nm}} = 0,1-0,12$  eingestellt. Spätestens nach 4 h Inkubation im Brutschrank haben die Streptokokken eine  $OD_{600\text{ nm}} = 0,3-0,4$  erreicht. Die Kulturen werden bei 1000 \*g für 10 Min abzentrifugiert, in 10 mL PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird in 1 mL PBS resuspendiert. Inokuli zwischen  $1,0 \cdot 10^4$  bis  $1,0 \cdot 10^8$  werden in Infektionsmedium eingestellt. Die inokulierten BHS-Einsätze werden für 4-10 h im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden Verdünnungsreihen des Inokulums und der Proben aus den unteren Kammern entweder auf Blutagar oder mit der 12-Kanal Multikanalpipette auf viereckige THY-Platten ausplattiert. Die Blutagarplatten werden üN und die THY-Platten für zwei Tage im Brutschrank inkubiert und danach werden die Kolonien ausgezählt.

### 3.10.2 TRYPANOSOMEN UND MAKROPHAGEN

#### 3.10.2.1 Trypanosoma brucei ssp.

Die Trypanosomen werden in ihren jeweiligen Medien bis zu möglichst hohen Zellzahlen kultiviert ohne, dass bei der mikroskopischen Kontrolle viele Aggregate aus abgestorbenen Trypanosomen sichtbar sind. Die für den Transmigrationsversuch vorgesehen Kulturen werden vereinigt, gut durchmischt und die Zellzahl wird bestimmt. Währenddessen werden die Trypanosomen bei 500 \*g für 10 Min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird in Infektionsmedium resuspendiert. Vor der Umstellung auf Quantum 286 wurde als Infektionsmedium M199 + 10 % FCS benutzt, danach wurde Quantum 286 ohne FCS-Zusatz verwandt. Transmigrationsversuche von *T. b. brucei* durch zellfreie Einsätze wurden in Baltz Complete durchgeführt. Das Volumen zur Resuspendierung wird entsprechend des gewünschten Inokulums gewählt. In dieser Arbeit wurden Inokuli zwischen  $1,0 \cdot 10^4$  und  $1,0 \cdot 10^7$  Trypanosomen pro Einsatz eingesetzt. Die ECV304-C6 BHS-Einsätze werden durch vorsichtiges Abkippen entleert und in neue Kammern mit jeweils 800 µL frischen, vorgewärmten Zellkulturmedium transferiert. In die Einsätze werden jeweils 300 µL der Trypanosomensuspension pipettiert und die Einsätze werden für 5 oder 6 h im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden die Einsätze entnommen und das Medium in der Kammer wird gut durchmischt. Die Trypanosomen werden mit einer Neubauer Zählkammer ausgezählt (3.6.1.1).

#### 3.10.2.2 J774-Makrophagen und Kotransmigration

Für die Transmigration werden die J774-Makrophagen in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert und gut gewachsene Kulturen werden abgeerntet. Für die Aktivierung der Makrophagen wird 24 h vor dem Transmigrationsassay 200 nM Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) in die Kulturflasche gegeben. Adhärente Zellen werden mit dem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst und die Zellzahl wird mit einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wird bei 100 \*g für 5 Min abzentrifugiert und in Infektionsmedium resuspendiert. Als Inokulum werden  $1,0 \cdot 10^6$  J774-Zellen pro ECV304-C6 BHS-Einsatz verwendet. Nach 5 h Inkubation im Brutschrank wird die Anzahl der transmigrierten Makrophagen in der unteren Kammer bestimmt. Um adhärente Makrophagen vom Kammerboden zu lösen wird ein kleiner Zellschaber verwendet. Für die Kotransmigrationsversuche werden pro BHS-Einsatz  $1 \cdot 10^6$  Makrophagen und Trypanosomen



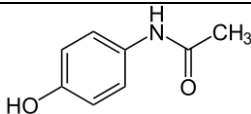
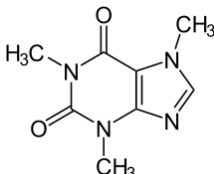
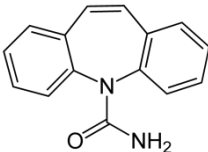
eingesetzt. Nach 5 h Inkubation im Brutschrank werden die Makrophagen in einer Fuchs-Rosenthal und die Trypanosomen in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt.

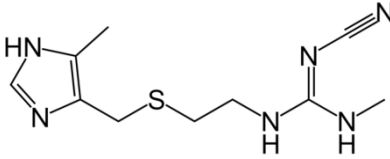
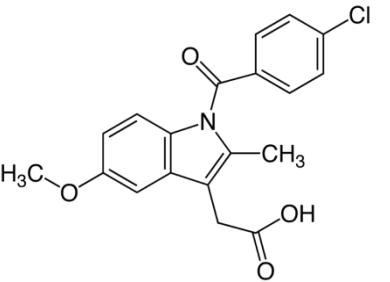
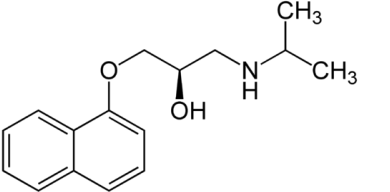
### 3.10.3 PERMEATION VON ARZNEISTOFFEN

Im Rahmen einer Kooperation mit der AG Prof. H. Wätzig wird die Permeabilität der ECV304-C6 BHS für Arzneistoffe untersucht. Arzneistoffe mit bekanntem Permeationsverhalten werden in die BHS-Einsätze gegeben und nach sechs Stunden wird die Konzentration des Arzneistoffes im Medium des Transwelleinsatzes als auch im Medium der unteren Kammer mittels mizellarer elektrokinetischer Kapillarchromatografie (MEKC) bestimmt. In einer Reihe von Vorversuchen werden zunächst das Laufverhalten der zu untersuchenden Arzneistoffe, gelöst in Zellkulturmedium Quantum 286, untersucht und entsprechende Eichspektren werden erstellt. Anhand dieser Eichspektren kann bei der zu messenden Probe die Substanz eindeutig identifiziert und deren Konzentration bestimmt werden. Weiterhin werden Stabilitätsmessungen durchgeführt, d.h. es wird untersucht, wie schnell die Arzneistoffe in Quantum 286 bei 37 °C degradieren.

Die Arzneistoffe wurden für eine Versuchsreihe stets frisch eingewogen, gelöst und sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte in Flaschen aus braunem Glas bei 4 °C. Die verwendeten Substanzen sind in Tab. 3.41 aufgelistet.

**Tab. 3.41: Arzneistoffe für Permeabilitätsstudien**

Arzneistoff	MW [g /mol]	Löslichkeit (in H <sub>2</sub> O)	Log BB [Referenz]	Strukturformel
Acetaminophen	151,16	++	-0,31 [1, 2]	
Koffein	194,19	+	-0,055 [3]	
Carbamezepin	236,27	-	-0,14 [4]	

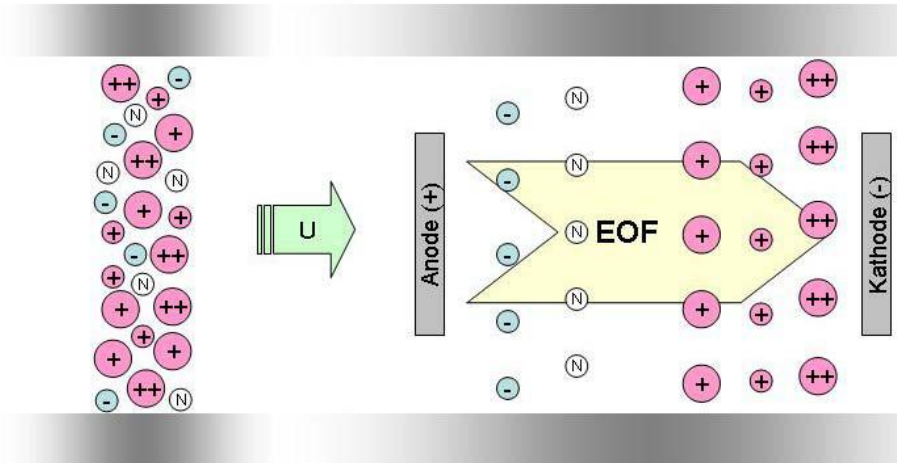
Arzneistoff	MW [g /mol]	Löslichkeit (in H <sub>2</sub> O)	Log BB [Referenz]	Strukturformel
Cimetidin	252,34	-	-1,42 [5]	
Indometacin	357,79	--	-1,26 [6]	
Propranolol	259,34	+	0,91 [7, 8]	
Referenzkürzel:				
[1, 2]= (de Lange <i>et al.</i> , 1994; Salminen <i>et al.</i> , 1997)			[5]= (Young <i>et al.</i> , 1988)	
[3]= (Nakazono <i>et al.</i> , 1992)			[6]= (Okuyama & Aihara, 1984)	
[4]= (Van Belle <i>et al.</i> , 1995)			[7, 8] = (Platts <i>et al.</i> , 2001; Yata <i>et al.</i> , 1990)	

Lösungsverhalten: „++“ = sehr gut; „+“ = löslich; „-“ = schwer löslich; „--“ = sehr schwer löslich;

**MW**= Molekulargewicht; **Log BB**= Verteilungskoeffizient zwischen Blutplasma und CSF

### 3.10.3.1 Mizellare elektrokinetische Kapillarchromatografie

Die MEKC ist eine Kapillarelektrophorese. Bei dieser Methode werden die Proben in einer Pufferlösung in einer Kieselglaskapillare aufgetrennt. An die Kapillare wird eine Spannung angelegt, so dass im Inneren ein elektroosmotischer Fluss (EOF) entsteht. Der EOF überlagert die Wanderung im elektrischen Feld und daher wandern alle Teilchen in Richtung der negativ geladenen Kathode. Die Auftrennung der Probe erfolgt aufgrund unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeiten (**Abb. 3.6**), die von der Größe, der Ladungsart und der Ladungsdichte der Teilchen abhängt. Bei der MEKC ist zusätzlich SDS im Probenpuffer und dies erlaubt auch die Auftrennung von unpolaren Substanzen. SDS bildet nach außen hin negativ geladenen Mizellen, die im EOF nahezu stationär sind. Unpolare Stoffe verteilen sich entsprechend ihrer Hydrophobizität zwischen der intramizellären und der extramizellären Phase. Je hydrophober ein Stoff, desto länger ist die Retentionszeit in der Mizelle. Der



**Abb. 3.6:** Der elektroosmotischer Fluss der Kapillarelektrophorese

Eine Probe wird in eine Kieselglaskapillare (grau) eingebracht. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung  $U$  entsteht ein EOF, der die Wanderung im elektrischen Feld überlagert. Alle Teilchen wandern in Richtung der negativ geladenen Kathode. Die Auftrennung erfolgt aufgrund unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeiten, die von der Ladungsart und -dichte und der Teilchengröße abhängen. Abb. aus (Ohnesorge, 2005)

Probenfluss wird an einem Diodenarraydetektor (DAD) vorbeigeleitet, welcher bei den durchgeführten Messungen ein Wellenspektrum von  $\lambda = 180\text{-}600\text{ nm}$  abdeckt. Als Ergebnis einer Messung erhält man ein dreidimensionales Spektrum aus den Werten für Wanderungszeit, Wellenlänge und Absorptionsintensität. Mit Hilfe entsprechender Eichspektren können die gesuchten Stoffe identifiziert werden. Die Konzentration der gemessenen Substanzen ist proportional zur Fläche unterhalb des Messspektrums. Das Erstellen der Eichspektren und die Durchführung der Probenvermessung wurden von Sascha Kühne, Apotheker, AG Prof. Wätzig durchgeführt.

### 3.10.4 TEST AUF TRANSMIGRATIONSINHIBITION

In einer Zusammenarbeit mit AG Prof. T. Schirmeister von der Universität Würzburg werden verschiedene Proteaseinhibitoren (PI), die gegen die sezernierte trypanosomale Cysteinprotease gerichtet sind, in dem ECV304-C6 BHS-Modell auf ihre Fähigkeit untersucht, die Transmigration von *Trypanosoma brucei gambiense* STIB930 zu unterbinden. Die Versuche wurden mit randomisierten Proben (PI1-PI3) durchgeführt (Tab. 3.42). Die Strukturformeln sind in

Tab. 3.43 ersichtlich. Die erhaltenen Proteaseinhibitoren wurden in je  $54\text{ }\mu\text{L}$  DMSO gelöst. Von der PI-Lösung wurden  $2\text{ }\mu\text{L}$  zu  $998\text{ }\mu\text{L}$  Trypanosomensuspension mit einer Konzentration von  $3,33 \cdot 10^6$  Trypanosomen /mL pipettiert. Von dieser Mischung wurden je  $300\text{ }\mu\text{L}$  auf einen

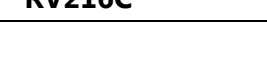
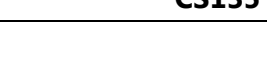
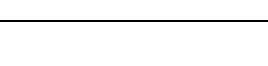
BHS-Einsatz gegeben. Als Kontrolle wurde DMSO ohne Inhibitoren eingesetzt. Nach sechs Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37 °C wurden die Anzahl der transmigrierten Trypanosomen bestimmt. Jeder PI wurde in drei Versuchsreihen mit je drei Parallelen getestet.

**Tab. 3.42: Verwendete Proteaseinhibitoren im Transwellversuch**

Probe	Kennung	Molekulargewicht [g/mol]	Einwaage [mg]	Rhodesain Ki [μM]	Tbb TC221 IC50 (48 h) [μM]	Tbb TC221 IC50 (72 h) [μM]
PI1	RV216C	593,68	10,94	1,6	28,45	25,33
PI2	CS135	621,72	6,51	1,72	12,42	16,81
PI3	CS138	621,72	5,32	2,92	9,48	16,35

**PI**= Proteaseinhibitor; **Ki**= Dissoziationskonstante (Inhibitorkonzentration zur 50 %igen Inhibition); **IC50**= Inhibitorkonzentration für halbmaximale Wachstumsinhibition; **Tbb**= *T. brucei brucei*;

**Tab. 3.43: Strukturformeln der Proteaseinhibitoren**

RV216C	CS135	CS138
		

### 3.11 WESTERN BLOT

Der Western Blot ist eine Methode, mit der sich über spezifische Antikörper bestimmte Proteine detektieren lassen. In diesem Fall werden Oberflächenproteine in Zelllysaten nachgewiesen, die für die Transmigration über die BHS wichtig sein könnten. Die Zelllysate werden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran geblottet. Auf dieser Membran erfolgt der Nachweis mittels eines primären Antikörpers, der das gesuchte Protein erkennt und eines sekundären Antikörpers, der eine Reaktion zur Visualisierung katalysiert.

### 3.11.1 SDS-PAGE

Bei einer SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamid Gel-Elektrophorese) (Laemmli, 1970) werden Proteine entsprechend ihrer Masse in einer Gelmatrix aus Polyacrylamid elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei werden entsprechend der Proteingröße unterschiedliche Acrylamidkonzentrationen eingesetzt. Die in dieser Arbeit verwendeten PA-Gele bestehen aus einem 4 %igen Sammelgel mit einem nachfolgenden 12 %igen Trenngel. Die verwendeten Chemikalien sind in Tab. 3.44 und das Pipettierschema für die Gele ist in Tab. 3.45 aufgelistet. Nach dem Gießen des Trenngels, wird dieses mit Isopropanol überschichtet um eine gleichmäßige Grenze zu erhalten. Die PA-Stammlösung enthält 30 % Acrylamid-Bisacrylamid in einem Verhältnis von 37,5:1. Die Gelmischung enthält neben PA noch APS (Ammoniumperoxodisulfat) und TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin). APS fördert durch Radikalbildung den Reaktionsstart und TEMED dient als Katalysator. Entsprechend Tab. 3.45 werden die Lösungen pipettiert und vermischt. Sind die Gele auspolymerisiert, können sie beladen werden. Hierfür werden die Proben mit SDS-Probenpuffer (Tab. 3.46) vermischt. Das darin enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol und das SDS denaturieren die Proteine. Bei diesem Prozess lagern sich SDS-Moleküle mit ihrem hydrophoben Schwanz an das Rückgrat der Proteine an. Auf diese Weise korreliert die Proteinmasse mit der elektrischen Ladung (negativ geladene Sulfatgruppen am SDS-„Kopf“) und die Proteine können entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden.

Als Proben werden Zellsuspensionen aus gut gewachsenen Zellkulturflaschen (HBMEC, ECV304, C6-Zellen) verwendet. Die Zellen werden trypsinisiert und bei 100 \*g für 5 Min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellpellets werden in 1 mL PBS resuspendiert und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Suspensionen werden erneut abzentrifugiert und in 1 mL PBS resuspendiert. Weiterhin werden 250  $\mu$ L 4fachen SDS-Probenpuffers zugesetzt und die Suspensionen werden für 5 Min bei 95 °C aufgeköcht. Danach werden die Proben mit einer Hamiltonspritze in die Geltaschen geladen. Als Negativkontrolle dient entsprechendes Zellkulturmedium. Als Größenstandard wird die „Page Ruler® prestained Protein-Ladder“ (Fermentas #SM0671) verwendet. Das Gel läuft bei 45 mA bis die Bromphenolbande das untere Gelende erreicht hat.

**Tab. 3.44: Reagenzien für die SDS-PAGE**

Reagenz	Zusammensetzung	Quelle
Rotiphorese Gel 30	wässrige 30 % Acrylamid-Bisacrylamidlösung (37,5:1)	Fa. Carl Roth
APS	10 % APS in dH <sub>2</sub> O	Fa. Carl Roth
TEMED		Fa. Carl Roth
TRIS-Puffer 1	0,5 M TRIS, 0,4 % SDS; pH 8,0	
TRIS-Puffer 2	1,5 M TRIS, 0,4 % SDS; pH 8,0	

**Tab. 3.45: Zusammensetzung 12 %iger SDS-Gele**

	Trenngel [μL]		Sammelgel [μL]	
	1	2	1	2
Gelanzahl				
H <sub>2</sub> O	1750	3500	1375	2750
TRIS-Puffer 1	-	-	625	1250
TRIS-Puffer 2	1250	2500	-	-
Acrylamid	2000	4000	500	1000
10 % APS	50	100	25	50
TEMED	5	10	2,5	5

**Tab. 3.46: SDS-Probenpuffer, 4fach**

30 %	Glycerin (v/v)
15 %	β-Mercaptoethanol
10 %	SDS (w/v)
0,2 %	Bromphenolblau
ad 300 mM	TRIS-HCl, pH 6,8

### 3.11.2 BLOTVERFAHREN UND DETEKTION

Die im Gel aufgetrennten Proteine werden in einem „semi dry blotting“ Verfahren auf eine PVDF-Membran (Immobilion® Transfer Membranes) übertragen. Die PVDF-Membran wird auf die Gelgröße zurecht geschnitten und ebenso wie das SDS-Gel in Towbin Puffer (Tab.

3.47) äquilibriert. Whatmanpapier wird auf die gleiche Größe zurecht geschnitten und ebenfalls in Towbinpuffer eingeweicht. Bei dem Beladen der Blotkammer ist darauf zu achten, dass die PVDF-Membran in Laufrichtung der Proteine, also in Richtung der Kathode, eingelegt ist. Auf die Anode (+) am Boden kommen zunächst drei Lagen Whatmanpapier. Darauf werden zunächst die PVDF-Membran, dann das SDS-Gel und abschließend wieder drei Lagen Whatmanpapier geschichtet. Jede Schicht wird luftblasenfrei auf die andere aufgeschichtet. Als Deckel dient die Kathode (-). Für die Dauer von 90 Min werden 50 mA und 12 V pro Gel angelegt. Nach dem Blotvorgang wird das Gel üN in einer Coomassie Färbelösung bei leichtem Schütteln und RT gefärbt (Tab. 3.48). Das SDS-Gel wird in Coomassie Entfärber gelegt (Tab. 3.48) und sobald die Hintergrundfärbung verschwunden ist und die Banden gut in Blau hervortreten, wird es in dH<sub>2</sub>O überführt. Die PVDF-Membran wird üN bei 4 °C im Blockierpuffer auf gleiche Weise behandelt. Am nächsten Tag wird die Membran für 1 h mit dem Erstantikörper bei leichtem Schütteln und RT inkubiert. Hiernach folgen drei Mal zehnminütige Waschschrte in TBS-T. Im Folgenden wird die Membran mit dem Zweitantikörper für 1 h bei leichtem Schütteln und RT inkubiert. Auch hiernach folgen drei Waschschrte in TBS-T. Der Zweitantikörper ist mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt (siehe auch 3.8.4.4) und zur Visualisierung wird die Membran für 10 Minuten in AP-Puffer inklusive 2 µL AP inkubiert (Schütteln bei RT) und schließlich solange in Färbelösung inkubiert bis die Banden sichtbar werden. Sowohl das Gel als auch die Membran werden eingescannt, auf Helligkeit und Kontrast optimiert und als jpg-Bilddatei abgespeichert.

**Tab. 3.47: Lösungen für den Westernblot**

<b>TBS-T</b>		
150	mM	NaCl
50	mM	TRIS HCl, pH 7,5
0,2	%	Tween 20
In		dH <sub>2</sub> O, pH auf 7,5 einstellen
<b>10fach Towbin</b>		
30,3	g	TRIS
144	g	Glycin
ad 1000	mL	MilliQ H <sub>2</sub> O
		autoklavieren

<b>1fach Towbin</b>		
100	mL	10fach Towbin
200	mL	Methanol
ad 1000	mL	MilliQ H <sub>2</sub> O
<b>Blockierpuffer</b>		
2,5	g	Milchpulver
20	µL	Tween 20
ad 20	mL	PBS
<b>AP-Puffer</b>		
100	mM	TRIS-HCl, pH 9,5
100	mM	NaCl
5	mM	MgCl <sub>2</sub> *6 H <sub>2</sub> O
<b>Detektionslösung</b>		
10	mL	AP-Puffer
39	µL	NBT (Nitroblue Tetrazolium) in 70 % DMF (Dimethylformamid)
39	µL	BCIP in DMF (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate)
<b>AP=</b> Alkalische Phosphatase		

**Tab. 3.48: Lösungen für die Coomassie-Färbung**

<b>Färbelösung</b>		
500	mL	Ethanol
100	mL	Essigsäure
1	g	Coomassie Brilliant Blue G250
ad 1000	mL	dH <sub>2</sub> O
Fa. Carl Roth		
<b>Entfärber</b>		
60	%	dH <sub>2</sub> O
30	%	Ethanol
10	%	Essigsäure



**Tab. 3.49: Verwendete Antikörper**

<b>AK Zielepitop</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Firma</b>
Lamininrezeptor	Maus (mc IgG1)	1:1.000	Santa Cruz sc-74531
PECAM-1	Maus (mc IgG1)	1:500	Santa Cruz sc-65260
2. AK-AP	Ziege Anti-Maus (IgG)	1:10.000	Thermo Scientific #31320

**AK**= Antikörper; **AP**= Alkalische Phosphatase (calf intestinal alkaline phosphatase); **mc**= monoklonal

### 3.12 VERSUCHSAUSWERTUNG UND STATISTIK

Jede Versuchsreihe der Transwellversuche wurde in Triplikaten durchgeführt und mindestens einmal, i.d.R. jedoch zweimal wiederholt. Andere Versuche wurden mindestens zweimal durchgeführt. Bei Wachstumsversuchen wurden je zwei Parallelansätze ausgewertet und die Versuche wurden mindestens einmal wiederholt. Aus den Einzelwerten wurde das arithmetische Mittel gebildet und die Standardabweichung wurde in Microsoft Excel 2007 mit der Funktion „STABW“ berechnet. Für die statistische Auswertung wurde die Student's t-Test-Funktion „TTEST“ in Microsoft Excel 2007 angewendet. Für die Auswertung der Transmigration der Streptokokken wurde i.d.R. auch die Transmigrationshäufigkeit berechnet. Diese ist der Anteil transmigrierter BHS-Transwelleinsätze an allen BHS-Transwelleinsätzen der jeweiligen Versuchsreihen und wird in Prozent angegeben.

## 4 ERGEBNISSE

Die Grundlage dieser Arbeit bilden *in vitro* Modelle der BHS. Die verwendeten BHS-Modelle wurden optimiert und charakterisiert, um die Transmigration von Trypanosomen und Streptokokken über die BHS zu untersuchen.

### 4.1 BHS-MODELLE

#### 4.1.1 CHARAKTERISIERUNG DES ECV304-C6 BHS-MODELLS

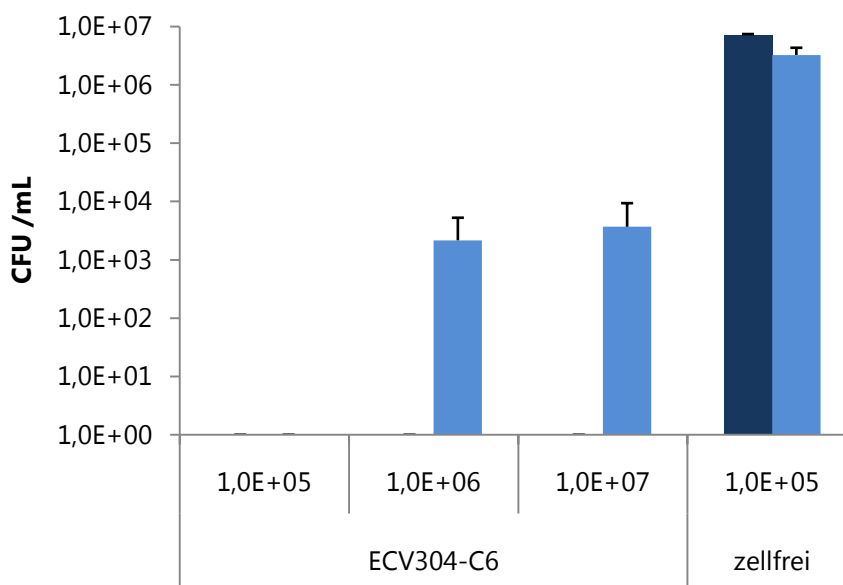
Konfluente Zellschichten gelten als dicht, wenn sie die parazelluläre Translokation restringieren. Das Kriterium für die Evaluierung der Dichtigkeit des ECV304-C6 BHS-Modells ist die Eigenschaft, die Transmigration von *E. coli* HB101 zu unterbinden. In früheren Arbeiten (Untucht, 2007) konnte eine Dichtigkeit von 80 % erzielt werden, die im Rahmen dieser Arbeit weiter optimiert werden konnte. Ein Vergleich der Transmigration des apathogenen *E. coli* HB101 mit dem neuroinvasiven *E. coli* K1 erlaubt Aussagen über die selektive Permeabilität eines BHS-Modells. Das optimierte ECV304-C6 BHS-System wurde hinsichtlich der zellulären Struktur mit Hilfe von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen und hinsichtlich der Arzneistoffpermeabilität näher charakterisiert.

##### 4.1.1.1 Selektive Permeabilität für *E. coli*

In einem ersten Schritt wurde der Einfluss verschiedener Medien auf die Dichtigkeit der ECV304-C6 BHS untersucht. Durch die Verwendung des serumfreien Quantum 286 Mediums anstatt des M199-Mediums mit diversen FCS-Chargen konnte die ECV304-C6 BHS hinsichtlich ihrer Dichtigkeit für eine Transmigration von *E. coli* HB101 auf 100 % optimiert werden. Im nächsten Schritt wurde die selektive Permeabilität durch den Vergleich der Transmigration des nicht invasiven Stammes *E. coli* HB101 mit dem potentiellen Meningitiserreger *E. coli* K1 evaluiert. Für diese Evaluation wurden die Inokuli und die Infektionszeit variiert.

Bei einer fünfstündigen Inkubation wurden Inokuli von  $10^5$ ,  $10^6$  und  $10^7$  *E. coli* pro BHS-Einsatz verwendet (**Abb. 4.1**). In einem Kontrollansatz wurden zellfreie Transwelleinsätze mit Matrigel mit einem Inokulum von  $10^5$  *E. coli* pro Transwelleinsatz inokuliert. Bei einem Inokulum von  $10^5$  *E. coli* pro BHS-Einsatz transmigrierte weder der Stamm HB101 noch K1. Die Erhöhung der Inokuli zeigte, dass *E. coli* HB101 weder bei  $10^6$  noch bei  $10^7$  Bakterien pro

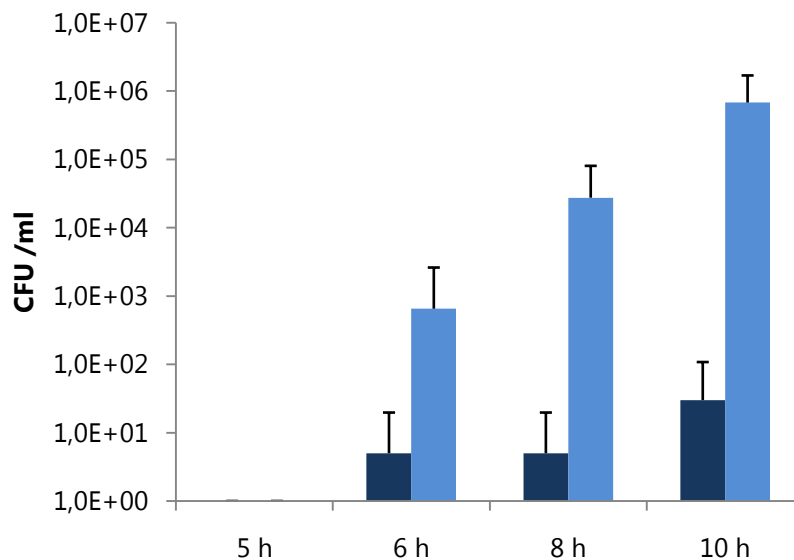
Einsatz die BHS überwinden konnte. *E. coli* K1 transmigrierte bei einem Inokulum von  $10^6$  Bakterien pro BHS-Einsatz mit  $2,16 \cdot 10^3$  CFU /mL +  $3,1 \cdot 10^3$  und bei einem Inokulum von  $10^7$  Bakterien pro BHS-Einsatz mit  $3,69 \cdot 10^3$  CFU /mL +  $5,56 \cdot 10^3$ . Im zellfreien Kontrolleinsatz wurden 1000fach höhere CFU /mL gezählt. *E. coli* HB101 transmigrierte die zellfreien Matrigelinsätze mit  $7,24 \cdot 10^6$  CFU /mL +  $1,70 \cdot 10^5$  und *E. coli* K1 mit  $3,25 \cdot 10^6$  CFU /mL +  $1,06 \cdot 10^6$ .



**Abb. 4.1:** Inokuli-abhängige Transmigration von *E. coli* HB101 und K1

Die angegebenen Werte sind die Inokuli pro BHS-Einsatz (**ECV304-C6**) oder zellfreien Transwelleinsatz (**zellfrei**). Nach 5 h wurden Proben entnommen und die CFU wurde bestimmt. *E. coli* HB101 (**dunkelblau**) war nicht in der Lage die BHS zu überwinden. *E. coli* K1 (**blau**) transmigrierte erst ab einem Inokulum von  $10^6$  Bakterien /Einsatz. Die Matrigelinsätze ohne BHS-Zellen wurden von beiden Stämmen wesentlich stärker überwunden.

Die Transmigration der beiden *E. coli* Stämme über die optimierte ECV304-C6 BHS wurde ebenfalls nach 5, 6, 8 und 10 h untersucht (**Abb. 4.2**). Für diese Versuche wurde ein Inokulum von  $10^5$  *E. coli* pro BHS-Einsatz gewählt. Nach 5 h Inkubation ist keine bakterielle Transmigration feststellbar. Nach 6 h wurden  $5,0 \cdot 10^0$  *E. coli* HB101 /mL +  $1,47 \cdot 10^1$  und  $6,52 \cdot 10^2$  *E. coli* K1 /mL +  $1,96 \cdot 10^3$  gezählt. Nach 8 h wurden  $5,0 \cdot 10^0$  *E. coli* HB101 /mL +  $1,47 \cdot 10^1$  und  $2,75 \cdot 10^4$  *E. coli* K1 /mL +  $5,29 \cdot 10^4$  detektiert. Nach zehnstündiger Inkubationszeit erhöhte sich die CFU /mL auf  $3,0 \cdot 10^1$  *E. coli* HB101 /mL +  $7,81 \cdot 10^1$  und  $6,78 \cdot 10^5$  *E. coli* K1 /mL +  $1,01 \cdot 10^6$ .



**Abb. 4.2:** Zeitabhängige Transmigration von *E. coli* HB101 und K1

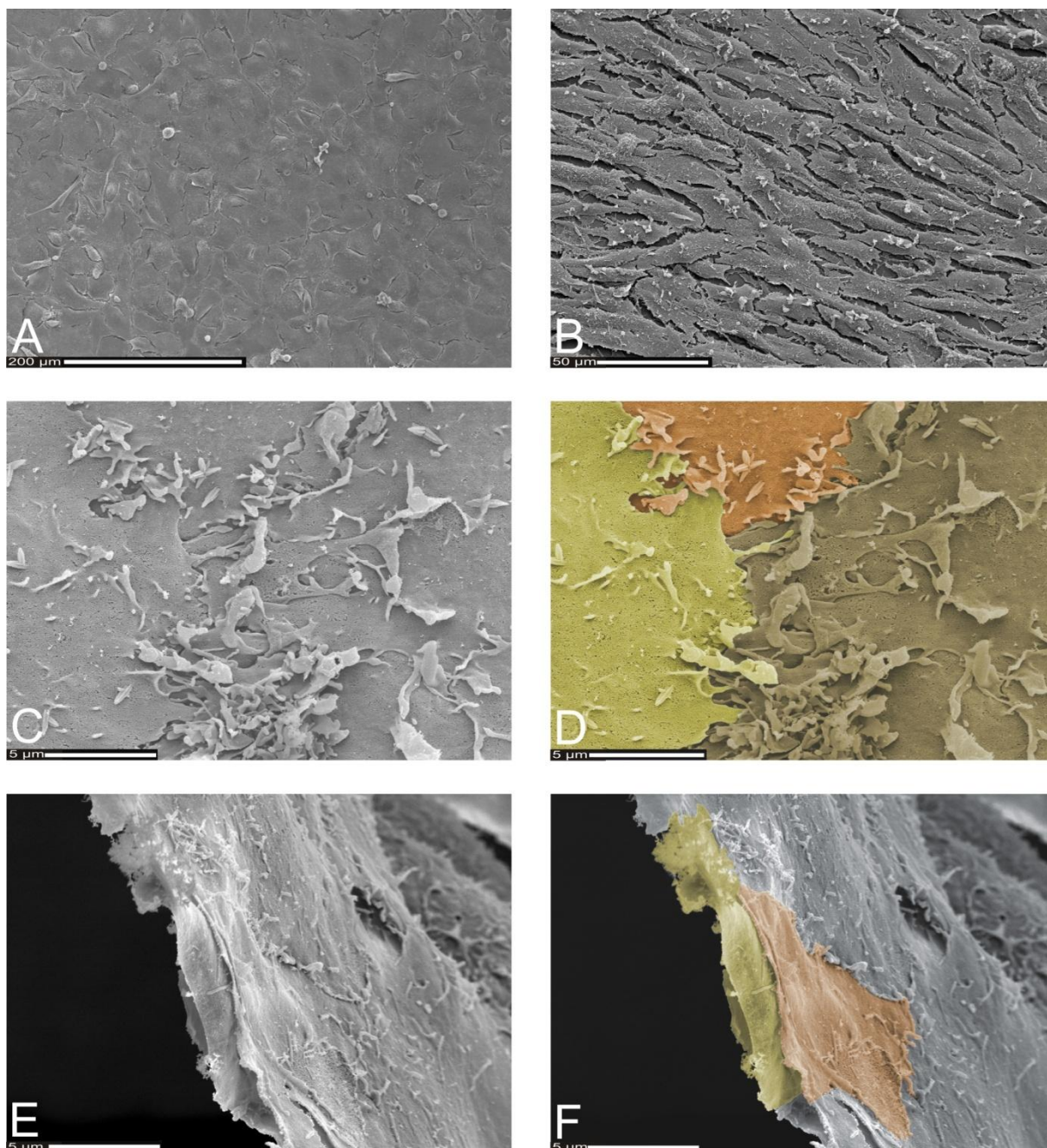
ECV304-C6 BHS-Einsätze wurden mit je  $10^5$  Bakterien inokuliert. Nach verschiedenen Infektionszeiten wurde die CFU /mL transmigrierter *E. coli* bestimmt. *E. coli* K1 (blau) zeigte mit zunehmender Infektionszeit eine ansteigende Transmigration. *E. coli* HB101 (dunkelblau) transmigrierte die ECV304-C6 BHS nur minimal. Nach 5 h wurden keine transmigrierten *E. coli* Stämme beobachtet.

Die Erhöhung des Inokulums und die Erhöhung der Infektionszeit zeigten eine selektive Permeabilität der ECV304-C6 BHS für den invasiven *E. coli* K1 Stamm. Hingegen war die Transmigration von *E. coli* HB101 sehr gering und erst bei einer erhöhten Infektionsdauer detektierbar.

#### 4.1.1.2 Rasterelektronenmikroskopie veranschaulicht Zellstruktur

Für die REM-Aufnahmen der optimierten ECV304-C6 BHS wurden die BHS-Einsätze fünf Tage im Brutschrank kultiviert und für die REM fixiert. Die Aufnahmen wurden von Prof. Dr. M. Rohde, HZI Braunschweig angefertigt.

Die Abbildungen zeigen die zelluläre Struktur der optimierten ECV304-C6 BHS (**Abb. 4.3**). Die ECV304-Zellen formierten eine dichte Zellschicht innerhalb des Transwelleinsatzes, die keine Lücken aufwies (**Abb. 4.3A**). Die C6-Zellen auf der Unterseite des BHS-Einsatzes bildeten nach fünf Tagen lockere Zell-Zellassoziationen mit größeren interzellularen Lücken und Spalten (**Abb. 4.3B**). Nahaufnahmen der ECV304-Zellgrenzen zeigten eine enge Zell-Zellinteraktion (**Abb. 4.3C, D**). Durch eine seitliche Aufsicht auf die Zellschicht wurde deutlich, dass die ECV304-Zellen einander teilweise überlappten (**Abb. 4.3E, F**). Die kolorierten Abbildungen wurden erstellt, um die Struktur des ECV304-Zellschicht zu verdeutlichen.



**Abb. 4.3:** REM Aufnahmen des optimierten ECV304-C6 BHS-Modells

Die ECV304-Zellen bildeten nach fünf Tagen eine dichte Zellschicht innerhalb des Transwelleinsatzes (**A**). Auf der Unterseite des Transwelleinsatzes wurden die C6-Zellen kopfüber kultiviert und zeigten nach fünf Tagen eine lockere Zell-Zellassoziatio

nahe mit zahlreichen Spalten zwischen den Zellen (**B**). Nahaufnahmen charakterisieren den Zusammenhalt der ECV304-Zellen untereinander (**C-F**): Die Zellen waren durch enge „puzzleteilartige“ Zell-Zellinteraktion miteinander verbunden (**C, D**). Eine seitliche Aufsicht auf die ECV304-Zellen zeigt, dass die einzelnen Zellen sich teilweise überlappten (**E, F**). **D** und **F** sind eigene Kolorierungen (Adobe PS7) zur Verdeutlichung der engen Zell-Zellinteraktionen.

Aufnahmen von apl. Prof. Dr. M. Rohde, HZI Braunschweig.

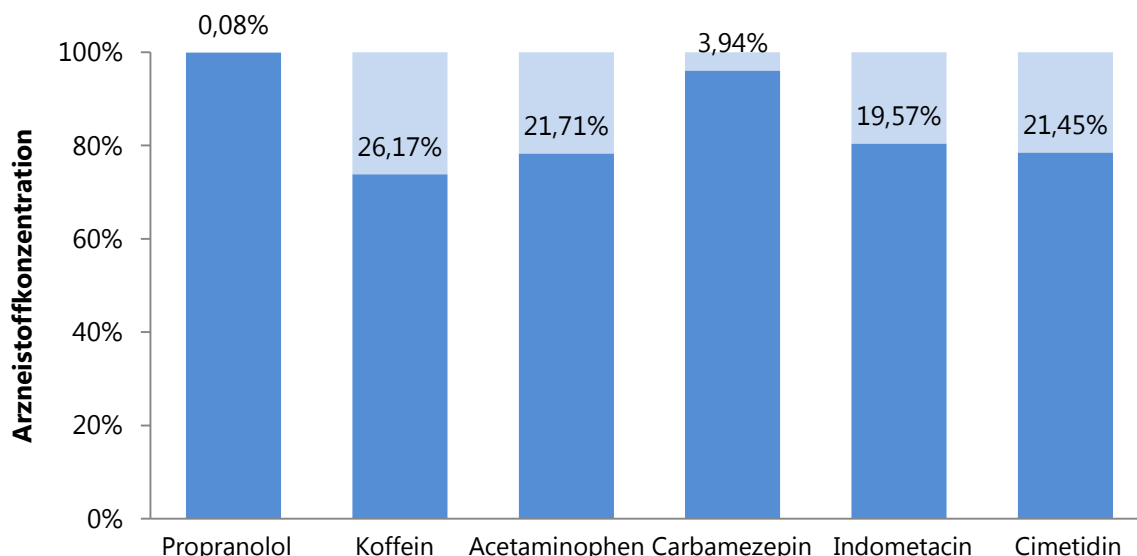
#### 4.1.1.3 Permeabilität für Arzneistoffe

Im Rahmen einer Kooperation mit Herrn Prof. Dr. H. Wätzig vom Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig wurde die Arzneistoffpermeabilität des optimierten ECV304-C6 BHS-Modells untersucht. Dadurch wurde das BHS-Modell in einem weiteren Aspekt grundlegend charakterisiert und es werden Anwendungen in kombinierten Arzneistoff-Trypanosomen-Interaktions- und Translokationsversuchen ermöglicht.

Für die Untersuchungen wurde eine Gruppe von sechs Arzneistoffen bestehend aus Propranolol, Koffein, Acetaminophen, Carbamezepin, Indometacin und Cimetidin zusammengestellt. Diese Arzneistoffe passieren unterschiedlich gut die BHS und es wurden bereits  $\log BB$ -Werte publiziert. Der Nachweis der Arzneistoffe in Zellkulturmedium erfolgte mittels mizellarer elektrokinetischer Kapillarchromatografie (MEKC) am Institut für Pharmazeutische Chemie. Die Anpassung und Optimierung der MEKC, sowie die Messungen und deren Auswertung wurden von Herrn Sascha Kühne, Apotheker, durchgeführt (Kuehne *et al.*, 2011). Das Generieren und die Kultur des ECV304-C6 BHS-Modells und die Durchführung der Permeabilitätsversuche wurden in der AG Prof. Dr. Steinert durchgeführt.

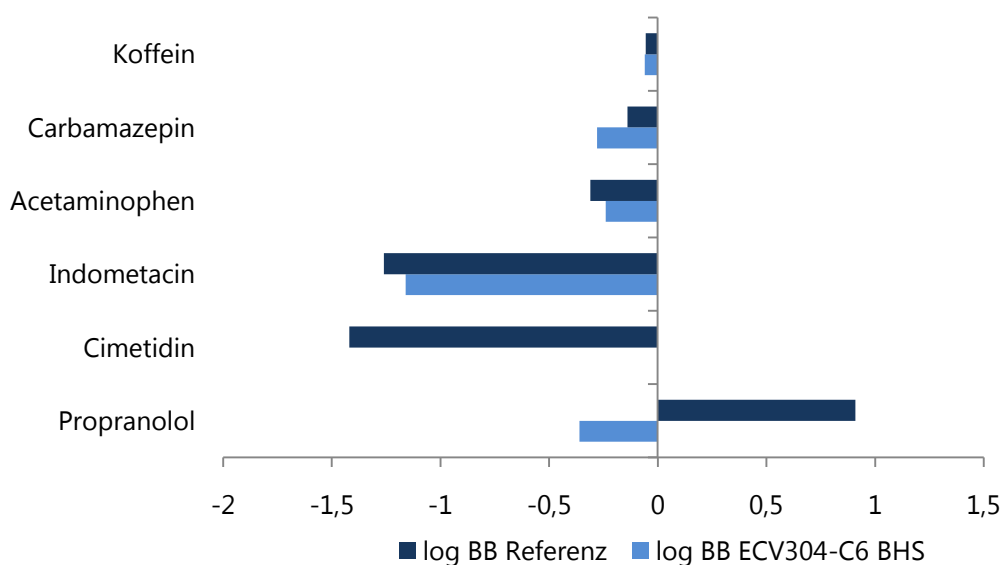
In Vorversuchen wurde zunächst die Stabilität der Arzneistoffe im Q286-Zellkulturmedium für die Dauer von 6 h evaluiert. Die Untersuchungen ergaben, dass während einer sechsständigen Inkubationszeit im Brutschrank die Arzneistoffe Koffein, Acetaminophen, Indometacin und Cimetidin Konzentrationsabnahmen zwischen 20 und 26 % aufwiesen. Die Konzentration von Carbamezepin sank um ca. 4 %. Im Fall von Propranolol wurde eine minimale Verringerung der Konzentration um 0,08 % festgestellt (**Abb. 4.4**). Die ermittelte Stabilität war zufriedenstellend und die Stoffkonzentrationen sanken nicht unter das Detektionslimit.

Die Arzneistoffe wurden in Zellkulturmedium mit einer Konzentration von 0,1 mg /mL auf die optimierte ECV304-C6 BHS gegeben. Nach einer sechsständigen Inkubationszeit wurde die Konzentration der Arzneistoffe in beiden Kompartimenten des Transwellsystems bestimmt. Aus den gemessenen Konzentrationen wurde das Verteilungsgleichgewicht  $\log BB$  berechnet und mit  $\log BB$ -Werten aus der Literatur verglichen (**Abb. 4.5**). Im Fall von Propranolol zeigte sich eine starke Abweichung zu dem Wert aus der Literatur. Für Cimetidin konnte kein  $\log BB$  berechnet werden, da diese Substanz die ECV304-C6 BHS nicht überwinden konnte. Die für die Arzneistoffe Koffein, Carbamezepin, Acetaminophen und Indometacin berechneten  $\log BB$ -Werte korrelierten gut mit den Literaturwerten (Tab. 4.1).



**Abb. 4.4:** Abnahme der Arzneimittelkonzentration unter Inkubationsbedingungen

Die Arzneistoffe (10 mg /mL) wurden in Zellkulturmedium für 6 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die kräftigen Farbsäulen (blau) zeigen die gemessene Arzneistoffkonzentration nach der Inkubation. In Prozent ist die Verringerung der Arzneistoffkonzentration (hellblau) im Vergleich zur Ausgangskonzentration angegeben. Propranolol und Carbamazepin zeigten nur geringe Verluste. Die übrigen Arzneistoffe verloren zwischen 20 und 26 % ihrer Konzentration.



**Abb. 4.5:** Vergleich der log BB Werte der ECV304-C6 BHS mit Literaturwerten

Die Arzneistoffe wurden in einer Konzentration von 0,1 mg /mL auf die ECV304-C6 BHS gegeben und nach 6 h wurden die Konzentrationen oberhalb und unterhalb der BHS gemessen. Dargestellt ist das Verteilungsgleichgewicht log BB. Angegeben sind die gemessenen log BB Werte. Propranolol zeigte eine starke Abweichung von den Literaturwerten. Cimetidin konnte die BHS nicht überwinden. Die Werte für Koffein, Carbamazepin, Acetaminophen und Indometacin zeigten eine gute Korrelation mit den Literaturwerten.

**Tab. 4.1: Berechnete Log *BB*-Werte im Vergleich mit Literaturwerten**

Arzneistoff	Log <i>BB</i> gemessen	Log <i>BB</i> Literatur	Referenz
Koffein	-0,06	-0,055	(Nakazono <i>et al.</i> , 1992)
Carbamezipin	-0,28	-0,14	(Van Belle <i>et al.</i> , 1995)
Acetaminophen	-0,24	-0,31	(de Lange <i>et al.</i> , 1994; Salminen <i>et al.</i> , 1997)
Indometacin	-1,16	-1,26	(Okuyama & Aihara, 1984)
Cimetidin	n.d.	-1,42	(Young <i>et al.</i> , 1988)
Propranolol	-0,36	0,91	(Platts <i>et al.</i> , 2001; Yata <i>et al.</i> , 1990)

Das Verteilungsgleichgewicht log *BB* berechnet sich wie folgt:  
Mit c = Konzentration des Arzneistoffes

$$\log BB = \log \frac{c \text{ (brain)}}{c \text{ (blood)}}$$

Die ECV304-C6 BHS zeigte im Rahmen der getesteten Arzneistoffe eine gute Übereinstimmung der *in vitro* Arzneistoffpermeabilität mit der *in vivo* Situation.



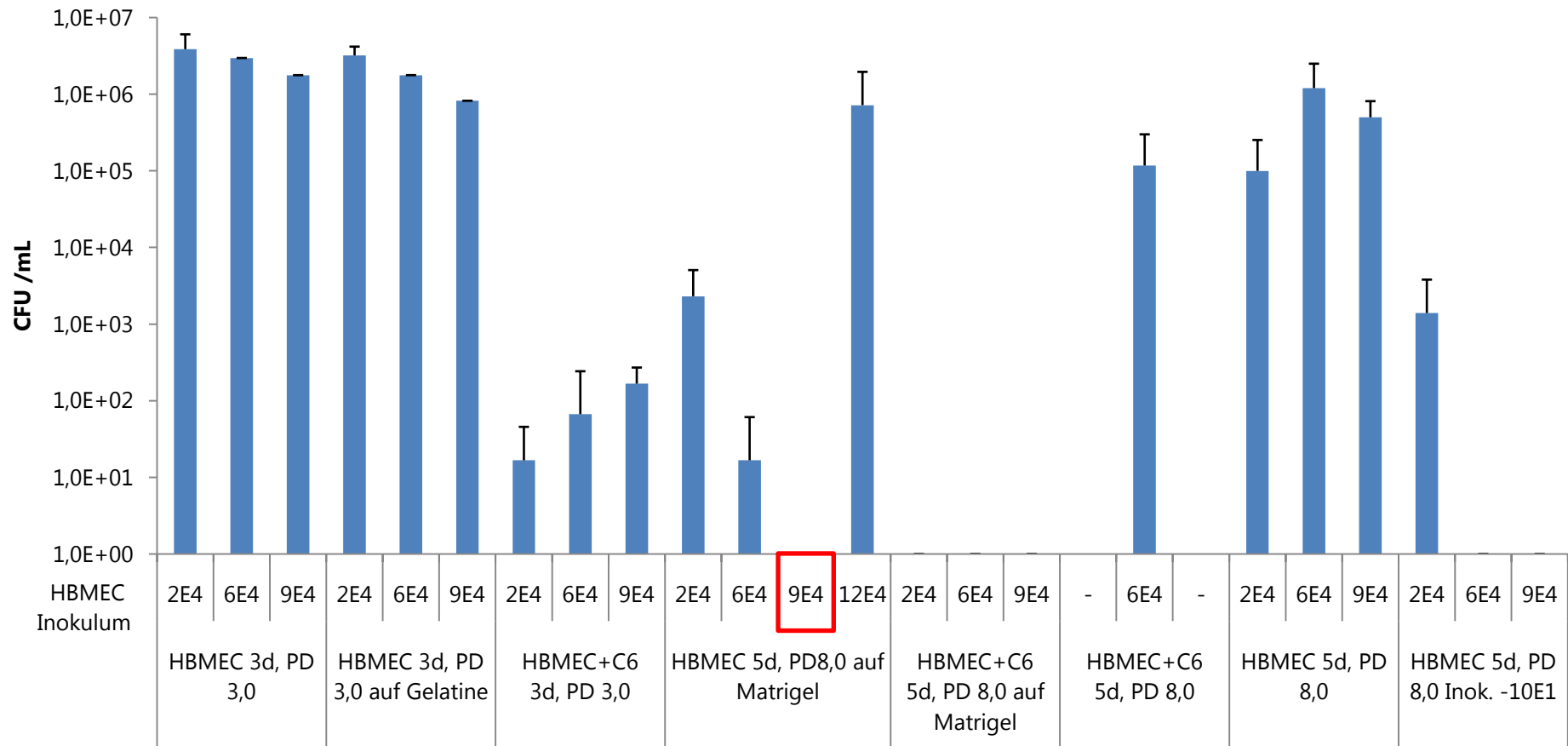
### 4.1.2 ETABLIERUNG DES HBMEC-MODELLS

Die HBMECs sind eine immortalisierte Zelllinie zerebralen endothelialen Ursprungs und für Infektionsstudien mit verschiedenen Pathogenen ein viel verwendetes Modellsystem. Das HBMEC BHS-Modell wurde in dieser Arbeit etabliert, um die Transmigration von Pneumokokken in diesem Modellsystem zu untersuchen.

#### 4.1.2.1 Evaluierung der *E. coli* HB101 Permeabilität

Mit dem Ziel, Bedingungen für ein dichtes HBMEC-Transwellsystem zu finden, wurden aufbauend auf den Erfahrungen durch die Etablierungsarbeiten des ECV304-C6 Modells diverse HBMEC-Modellsysteme generiert und in Transmigrationsversuchen mit *E. coli* HB101 evaluiert (**Abb. 4.6**).

Die Inokuli der HBMECs variierten zwischen  $2 \cdot 10^4$ ,  $6 \cdot 10^4$ ,  $9 \cdot 10^4$  sowie  $1,2 \cdot 10^5$  Zellen pro Einsatz. In einigen Varianten wurden auf die Unterseite der Transwelleinsätze  $5 \cdot 10^4$  C6-Gliazellen aufgebracht. Weiterhin wurden Transwelleinsatzmembranen mit unterschiedlichen Porengrößen von 3,0 oder 8,0  $\mu\text{m}$  und verschiedenen Membranbeschichtungen aus Matrigel oder Gelatine verwendet. Unbeschichtete Transwelleinsätze wurden ebenfalls getestet. Einsätze mit Matrigel wurden fertig beschichtet bezogen, während die Gelatinebeschichtung selbst durchgeführt wurde. Die BHS-Modelle wurden für drei oder fünf Tage im Brutschrank ohne einen Mediumwechsel kultiviert. Die Permeabilität der jeweiligen BHS-Einsätze wurde über die Transmigrationsfähigkeit von *E. coli* HB101 evaluiert. BHS-Varianten, die eine Transmigration von *E. coli* HB101 aufwiesen, wurden verworfen. Die Variante mit unbeschichteten Membraneinsätzen mit einer Porengröße von 3  $\mu\text{m}$  und einer dreitägigen Kulturdauer ebenso wie die Variante mit den Gelatine-beschichteten Einsätzen zeigten die höchsten Transmigrationsraten. Die übrigen BHS-Modelle ohne Membranbeschichtung zeigten ebenfalls eine Transmigration von *E. coli* HB101, außer in zwei von drei Varianten, bei denen das *E. coli* HB101 Inokulum um eine Zehnerpotenz geringer ausfiel. Matrigeleinsätze mit HBMEC-Inokuli von  $2 \cdot 10^4$  und  $6 \cdot 10^4$  und auch bei  $1,2 \cdot 10^5$  Zellen pro Einsatz waren ebenfalls für *E. coli* HB101 durchgängig. Als dichte BHS-Modelle erwiesen sich  $9 \cdot 10^4$  HBMECs pro Matrigeleinsatz bei Kulturdauer von fünf Tagen sowie die Versuchsreihen mit einer fünftägigen Kokultur von HBMECs und C6-Zellen in Kombination mit Matrigeleinsätzen. Für die weiteren Transmigrationsversuche wurde die Variante „ $9 \cdot 10^4$  HBMECs pro Matrigeleinsatz und einer Kulturdauer von fünf Tagen gewählt (**Abb. 4.6**).



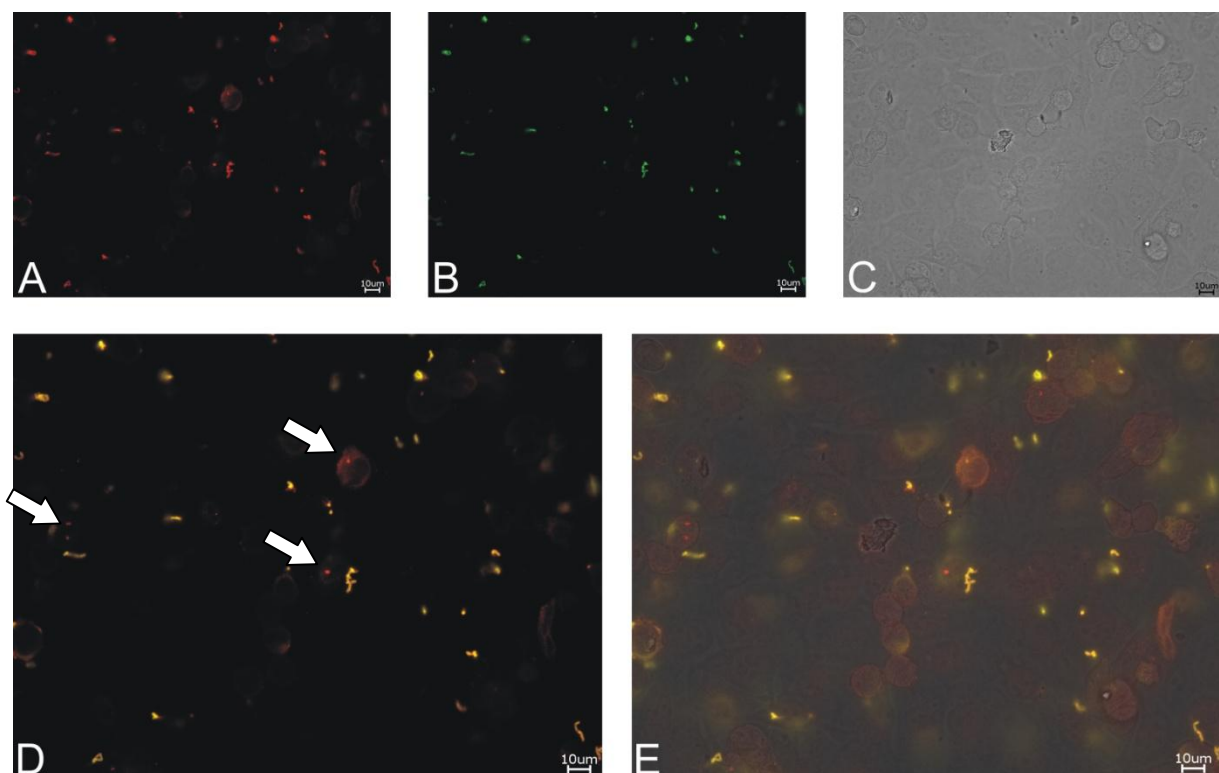
**Abb. 4.6:** Evaluierung verschiedener HBMEC BHS-Modelle anhand der Permeabilität für *E. coli* HB101

Die Einsätze mit verschiedenen Porendurchmessern (PD [µm]) wurden z. T. mit **Gelatine** oder waren mit **Matrigel** beschichtet. Das HBMEC-Inokulum variierte zwischen 2, 4, 6 und 12·10<sup>4</sup> Zellen /Einsatz (**2E4**, **6E4**, **9E4**, **12E4**). Einige Varianten beinhalteten die Kokultur mit 5·10<sup>4</sup> **C6** Gliazellen auf der Einsatzunterseite. Die BHS-Modelle wurden drei (**3d**) oder fünf (**5d**) Tage ohne Medienwechsel im Brutschrank inkubiert. Zur Evaluierung wurden 1,0·10<sup>5</sup> *E. coli* HB101 pro Transwelleinsatz inokuliert. Transmigrierte *E. coli* wurden nach 6 h ausplattiert. Nicht permeable BHS-Modelle waren 9·10<sup>4</sup> HBMEC auf Matrigeleinsätzen bei fünf Tagen Kultur, 2, 6 und 9·10<sup>4</sup> HBMEC+C6 auf Matrigeleinsätzen bei fünf Tagen Kultur oder 9·10<sup>4</sup> HBMEC auf Matrigeleinsätze bei fünf Tagen Kultur, bei denen das Inokulum um eine Zehnerpotenz (**Inok.-10E1**) geringer war. Die Variante, die für alle weiteren Transmigrationsversuche verwendet wurde, ist gekennzeichnet (**roter Kasten**).

#### 4.1.2.2 Immunofluoreszenzmikroskopie invasiver Pneumokokken

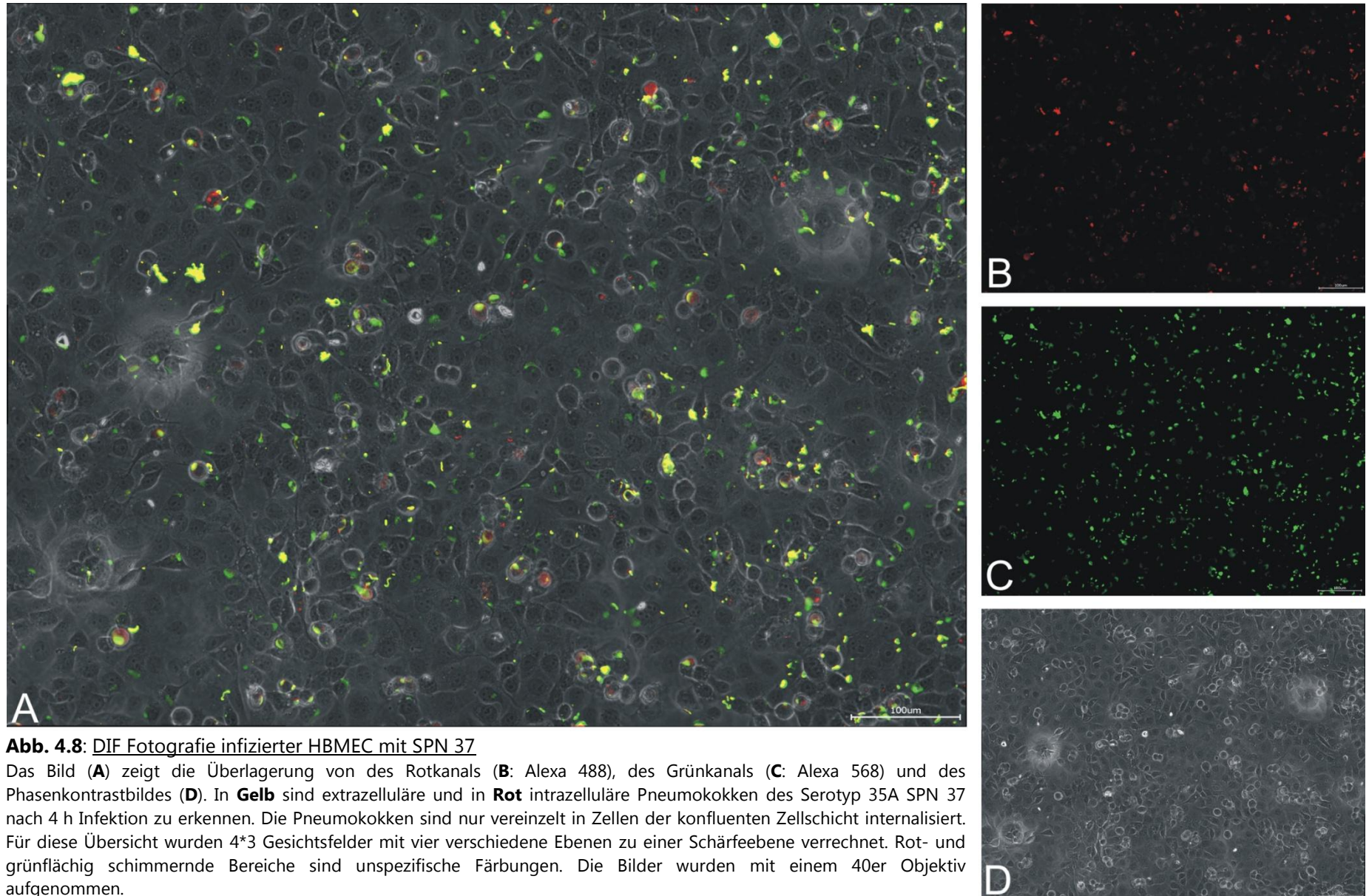
Alle in dieser Arbeit verwendeten HBMECs stammen von einer Passage ab und wurden vor der Verwendung auf die Empfänglichkeit für Pneumokokkeninfektionen getestet. Im Rahmen einer Mikroskopbegutachtung wurde das Keyence Bioevo BZ-9000 genutzt, um exemplarisch für einen Pneumokokkenstamm zu überprüfen, ob dieser an die HBMECs adhären und in diese eindringen konnte.

Für die Infektionsstudien wurde der „Laborstamm“ Serotyp 35A SPN 37 verwendet. Nach einer vierstündigen Inkubationszeit mit einem Inokulum von  $2,0 \cdot 10^5$  SPN /mL zeigte sich, dass die Pneumokokken an HBMEC-Zellen adhären (**Abb. 4.7D, E: gelbe Punkte**) und vereinzelt in diese eindringen konnten (**Abb. 4.7D, E: Pfeile auf rote Punkte**). Einen Gesamteindruck von der infizierten Zellschicht auf dem Deckgläschen erhielt man durch das Verschmelzen mehrere Gesichtsfelder zu einem großflächigen Gesamtbild (**Abb. 4.8**).



**Abb. 4.7:** DIF Fotografie infizierter HBMEC mit SPN 37

Bild A (**A**) zeigt die rote Fluoreszenz von Alexa 488 und Bild B (**B**) die grüne Fluoreszenz von Alexa 568. In Bild (**C**) wurde die Zellschicht im DIC aufgenommen. Die Bilder wurden überlagert: **D**: Überlagerung A & B; **E**: Überlagerung A, B & C. Die HBMEC-Zellen bildeten eine konfluente Zellschicht (**C**). Erst in der Überlagerung des Rot- und des Grünkanals kann man zwischen intra- (rote Punkte) und extrazellulären (gelbe Punkte) Pneumokokken unterscheiden. Nach 4 h Infektionszeit wurden in diesem Gesichtsfeld drei Zellen infiziert (**weiße Pfeile**). In Gelb erkennt man adhären Pneumokokken (**gelbe Punkte**), die zahlreicher sind als internalisierte Pneumokokken (rote Punkte). Die Zellen werden schwach unspezifisch angefärbt. Die Bilder wurden mit einem 60er Objektiv aufgenommen. Pro Gesichtsfeld wurden mehrere Ebenen abfotografiert. Bei der nachfolgenden Bildbearbeitung wurde ein Z-Stapel aus je neun Einzelbildern zu einer Schärfenebene verrechnet.



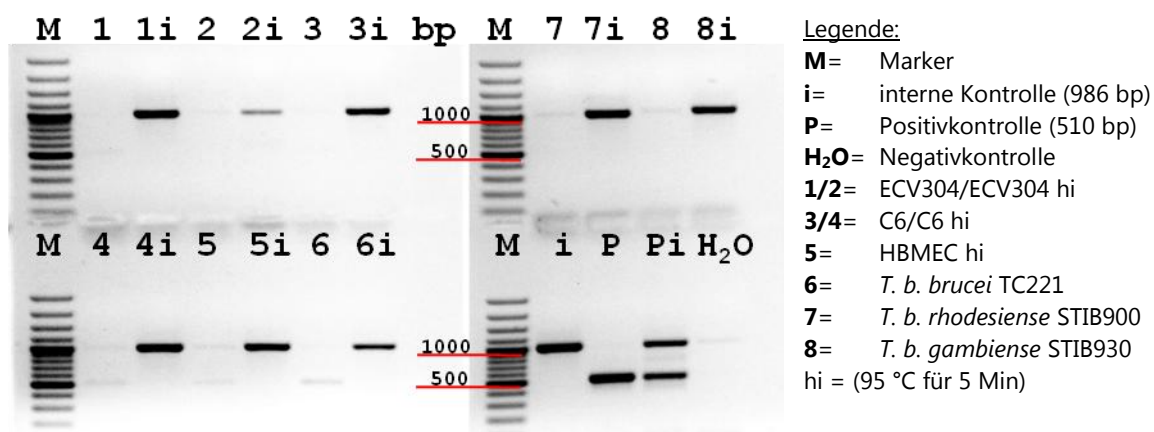
**Abb. 4.8:** DIF Fotografie infizierter HBMEC mit SPN 37

Das Bild (**A**) zeigt die Überlagerung von des Rotkanals (**B**: Alexa 488), des Grünkanals (**C**: Alexa 568) und des Phasenkontrastbildes (**D**). In **Gelb** sind extrazelluläre und in **Rot** intrazelluläre Pneumokokken des Serotyp 35A SPN 37 nach 4 h Infektion zu erkennen. Die Pneumokokken sind nur vereinzelt in Zellen der konfluenten Zellschicht internalisiert. Für diese Übersicht wurden 4\*3 Gesichtsfelder mit vier verschiedene Ebenen zu einer Schärfenebene verrechnet. Rot- und grünflüchig schimmernde Bereiche sind unspezifische Färbungen. Die Bilder wurden mit einem 40er Objektiv aufgenommen.

### 4.1.3 AUSSCHLUSS VON MYKOPLASMEN

Mykoplasmen sind dafür bekannt, dass sie Zellkulturen ohne die typischen Anzeichen einer bakteriellen Kontamination wie Trübung oder Verfärbung des Mediums besiedeln können. Mykoplasmen leben auf der Oberfläche eukaryotischer Zellen und können das Zellverhalten verändern (Uphoff & Drexler, 2005a). Für reproduzierbare und aussagekräftige Ergebnisse muss die Kontamination mit Mykoplasmen ausgeschlossen werden. Hierfür wurden die Zellkulturüberstände auf mykoplasmaspezifische DNA mittels PCR überprüft.

Die Mykoplasmen-PCR basiert auf einem Protokoll von Herrn Dr. C. Uphoff von der DSMZ in Braunschweig (Uphoff & Drexler, 2005b) und wurde erfolgreich für die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wie ECV304, C6 und HBMEC sowie für die Trypanosomenstämme STIB900, STIB930 und TC221 angewendet. Die Abbildung zeigt das Ergebnis der Mykoplasmen-PCR (**Abb. 4.9**). Für jede Probe wurde eine interne Kontrolle durchgeführt, die anzeigt, dass die PCR funktioniert hat. Die Bande der internen Kontrolle ist bei ca. 1000 bp sichtbar. Die Positivkontrolle enthält Mykoplasmen-DNA und wird als Bande bei 510 bp sichtbar. Wäre einer der Proben kontaminiert gewesen, wären Fragmente mit ähnlicher Größe amplifiziert worden. In allen getesteten Ansätzen konnte keine Mykoplasmenkontamination nachgewiesen werden.



**Abb. 4.9:** Gelfotografie einer Mykoplasmen-PCR

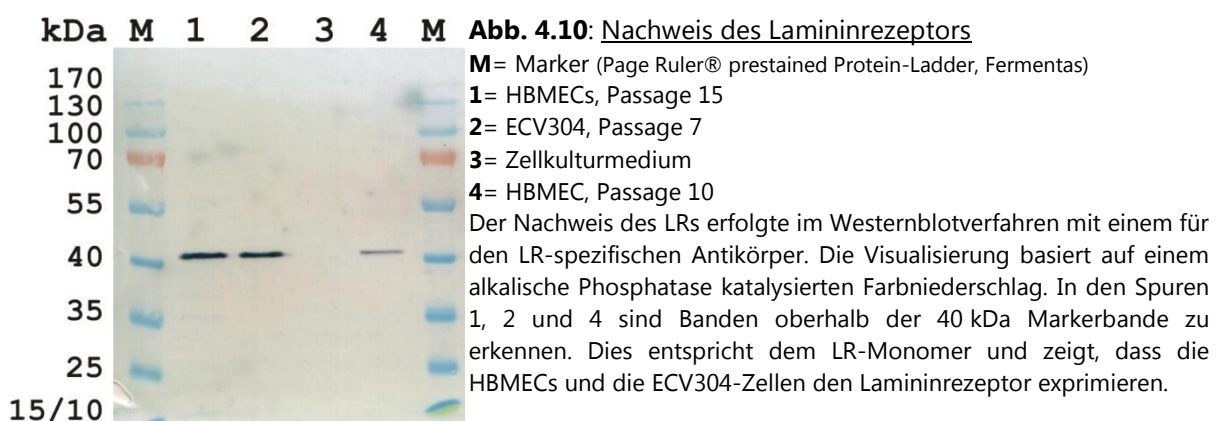
Die Zusammenstellung zeigt das Ergebnis aller durchgeführten PCRs. In einigen Fällen wurden die Proben vorher bei 95 °C für 5 Min aufgekocht (**hi**). Jede Probe wurde mit einer internen Kontrolle (**i**) zum Nachweis einer erfolgreichen PCR angesetzt und zeigte eine Bande bei 986 bp. Die Positivkontrolle (**P**) enthält Mykoplasmen-DNA und zeigte eine Bande bei 510 bp. Alle getesteten Zelllinien und Trypanosomenstämme waren frei von Mykoplasmen-DNA.



#### 4.1.4 NACHWEIS DES LAMININREZEPTORS

Der 37/67 kDa Lamininrezeptor (LR) auf der Zelloberfläche von humanem zerebralem Kapillarendothel ist ein wichtiger Rezeptor für Pathogen-Wirtszellinteraktionen und gilt als eines der zentralen Oberflächenproteine, die für den ZNS-Tropismus u.a. von Pneumokokken verantwortlich sind (Orihuela *et al.*, 2009). Der Nachweis des LRs auf den verwendeten Zelllinien erlaubt eine Aussage über die Eignung von Zellen für BHS-Modelle, die zur Untersuchung der Transmigration von Pneumokokken und anderen Pathogenen verwendet werden.

In dieser Arbeit wurden das optimierte ECV304-C6 BHS-Modell und das HBMEC BHS-Modell auf die Expression des LRs untersucht. Für den Nachweis des LRs wurden HBMECs in den Passagen 10 und 15 sowie ECV304 der Passage 7 verwendet. Als Negativkontrolle wurde das HBMEC-Zellkulturmedium aufgetragen. Für die Detektion wurden ein LR-spezifischer Antikörper und ein Visualisierungsverfahren mit alkalischer Phosphatase verwendet. Auf dem Westernblot (**Abb. 4.10**) sind Banden für die HBMECs beider Passagen in den Spuren 1 und 4 und für die ECV304-Zellen in Spur 2 oberhalb der 40 kDa Bande zu erkennen. Dieser Größe entspricht das zytosolische Monomer des LRs. Spur 3 enthält Zellkulturmedium und zeigt keine Bande. Die Expression des LRs konnte für ECV304 und HBMEC-Zellen nachgewiesen werden.



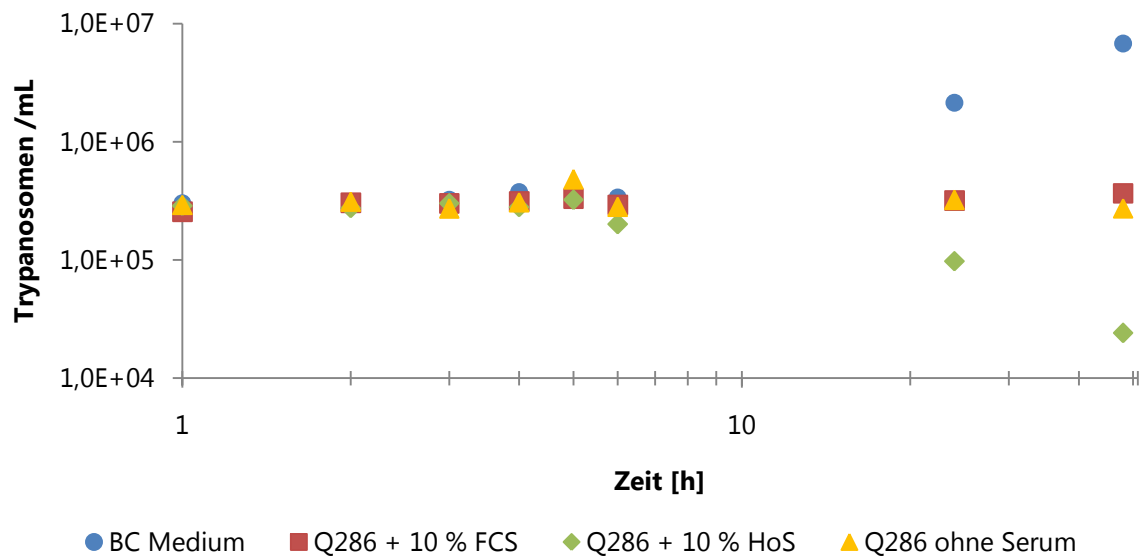
## 4.2 TRYPANOSOMEN

Humanpathogene afrikanische Trypanosomen sind die Verursacher der afrikanischen Schlafkrankheit. Die Parasiten vermehren sich im Blutkreislauf, überwinden die BHS und infizieren das ZNS. Das optimierte ECV304-C6 BHS-Modell wurde verwendet, um die Transmigration von verschiedenen Trypanosomenstämmen über die BHS zu untersuchen.

### 4.2.1 TRYPANOSOMALES WACHSTUM IN INFEKTIONSMEDIEN

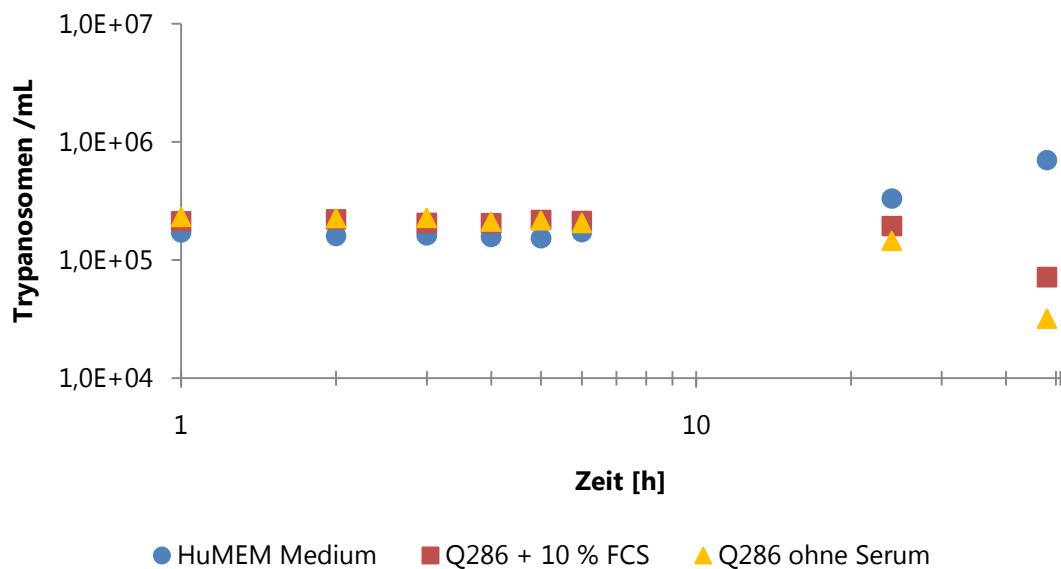
Trypanosomales Wachstum im Infektionsmedium kann die Anzahl an transmigrierten Trypanosomen verfälschen. Daher wurde die Auswirkung von verschiedenen Infektionsmedien auf das trypanosomale Wachstum untersucht.

Bei den Infektionsmedien handelt es sich um das Zellkulturmedium Quantum 286 (Q286) mit und ohne Zusätze verschiedener Seren. Als Kontrolle, dass die Trypanosomen anwachsen, wurden sie auch in ihrem Standardmedium inokuliert. Neben dem Tierpathogen *T. b. brucei* TC221 wurde stellvertretend für die humanpathogenen Arten *T. b. gambiense* STIB930 für die Wachstumsversuche herangezogen. In **Abb. 4.11** sind die Messwerte für *T. b. brucei* TC221 dargestellt. Innerhalb der ersten 6 h wurde stündlich die Zellzahl /mL bestimmt und ausgehend von einem Inokulum von  $5 \cdot 10^5$  Trypanosomen /mL  $+5,92 \cdot 10^4$  zeigten sich keine Veränderungen in allen vier getesteten Medien. Erst nach 24 und 48 h zeigten sich Unterschiede. Während die Zellzahl in Q286-Medium mit und ohne FCS konstant blieb, fiel sie in Q286-Medium mit 10 % „Horse“ Serum (HoS) auf  $2,41 \cdot 10^4$  Trypanosomen /mL  $+1,62 \cdot 10^4$  ab. Im Standardmedium Baltz Complete (BC) stieg sie hingegen auf  $6,77 \cdot 10^6$  Trypanosomen /ml  $+1,44 \cdot 10^6$  an. Bei den Wachstumsanalysen mit *T. b. gambiense* STIB930 (**Abb. 4.12**) zeigte sich ebenfalls, dass die Zellzahl der Trypanosomen ausgehend von einem Inokulum von  $2,86 \cdot 10^5$  Trypanosomen /mL  $+8,83 \cdot 10^4$  bis zum 6 h Wert annähernd gleich blieb. Danach fiel die Zellzahl in den Infektionsmedien beim 48 h Wert in Q286-Medium ohne FCS auf  $3,19 \cdot 10^4$  Trypanosomen /mL  $+2,08 \cdot 10^4$  und in Q286-Medium +10 % FCS auf  $7,17 \cdot 10^4$  Trypanosomen /mL  $+2,25 \cdot 10^4$  ab. Die Trypanosomen vermehrten sich in ihrem Standardmedium auf  $7,02 \cdot 10^5$  Trypanosomen /mL  $+9,45 \cdot 10^4$ . Alle Werte der Wachstumsversuche sind in Tab. 6.1 und Tab. 6.2 im Anhang S. 172 aufgelistet.



**Abb. 4.11:** Wachstum von *T. b. brucei* TC221 in verschiedenen Medien

Die Startkonzentration der Trypanosomen betrug  $5 \cdot 10^5$  Zellen/ mL. Innerhalb von 6 h wurden stündlich Messwerte erhoben und die Zellzahl blieb nahezu konstant. Erst nach 24 und 48 h zeigten sich Unterschiede zwischen den einzelnen Medien. In Q286 mit und ohne FCS blieb die Zellzahl relativ unverändert, während die Trypanosomen in Q269 mit 10 % HoS abstarben. In ihrem Kulturmedium Baltz Complete (BC) vermehrten sich die Trypanosomen. Werte und Standardabweichung siehe Tab. 6.1 im Anhang S. 172.



**Abb. 4.12:** Wachstum von *T. b. gambiense* STIB930 in verschiedenen Medien

Die Startkonzentration der Trypanosomen betrug  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen/ mL. Innerhalb von 6 h wurden stündlich Messwerte erhoben und die Zellzahl blieb nahezu konstant. Erst nach 24 und 48 h zeigten sich Unterschiede zwischen den einzelnen Medien. In Q286 mit und ohne FCS blieb die Zellzahl annähernd unverändert, während die Trypanosomen sich in ihrem Kulturmedium Baltz Complete vermehrten. Werte und Standardabweichung siehe Tab. 6.2 im Anhang S. 172.

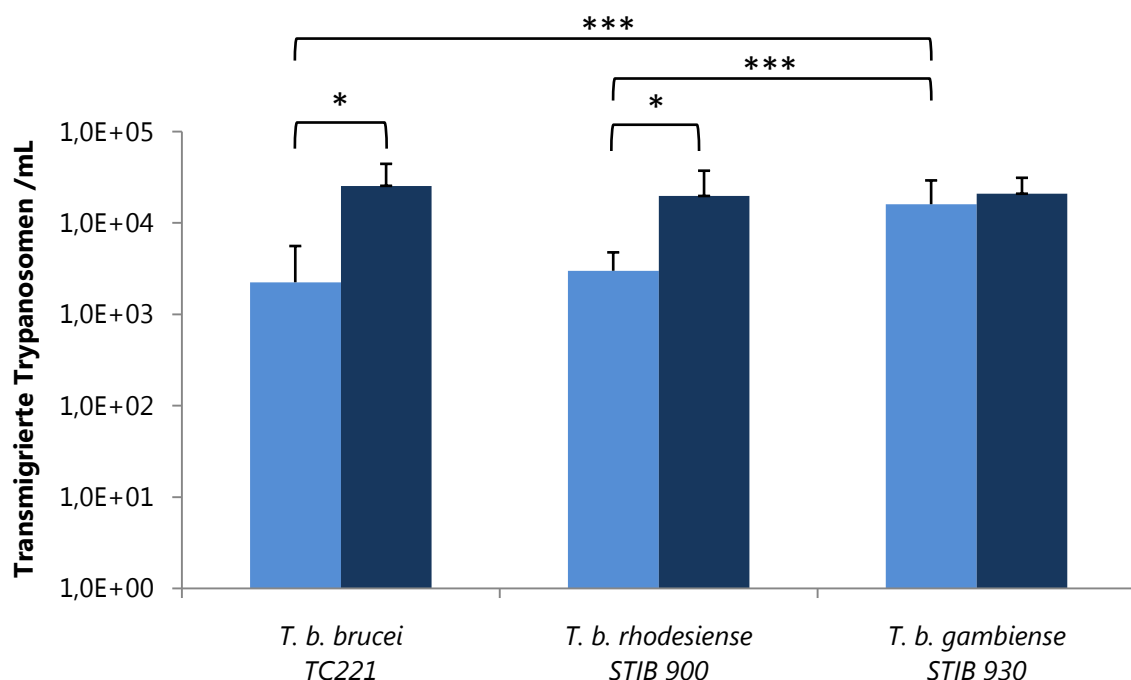


## 4.2.2 TRANSMIGRATION ÜBER DAS ECV304-C6 BHS-MODELL

Die Transmigrationsversuche wurden mit den humanpathogenen Stämmen *T. b. gambiense* STIB930 und *T. b. rhodesiense* STIB900, sowie dem tierpathogenen Stamm *T. b. brucei* TC221 durchgeführt. Mit Trypanosomen infizierte ECV304-C6 BHS-Einsätze wurde im Rasterelektronenmikroskop untersucht. Um die Frage zu beantworten, ob Trypanosomen aus dem ZNS die Blutbahn reinfizieren können, wurde ein inverses ECV304-C6 BHS-Modell (BHS<sub>i</sub>) generiert und in Transmigrationsversuchen eingesetzt.

### 4.2.2.1 Bidirektionale Transmigration

Die Transmigration über die ECV304-C6 BHS wurde mit zwei verschiedenen Inokuli untersucht. Bei einem Inokulum von  $10^6$  Trypanosomen pro BHS-Einsatz und 6 h Infektionszeit transmigrierte *T. b. brucei* TC221 mit  $2,24 \cdot 10^3$  Trypanosomen /mL  $+ 3,35 \cdot 10^3$  und *T. b. rhodesiense* STIB900 mit  $2,99 \cdot 10^3$  Trypanosomen /mL  $+ 1,77 \cdot 10^3$  (**Abb. 4.13**). Die signifikant höchste Transmigration zeigte *T. b. gambiense* STIB930 mit  $1,60 \cdot 10^4$

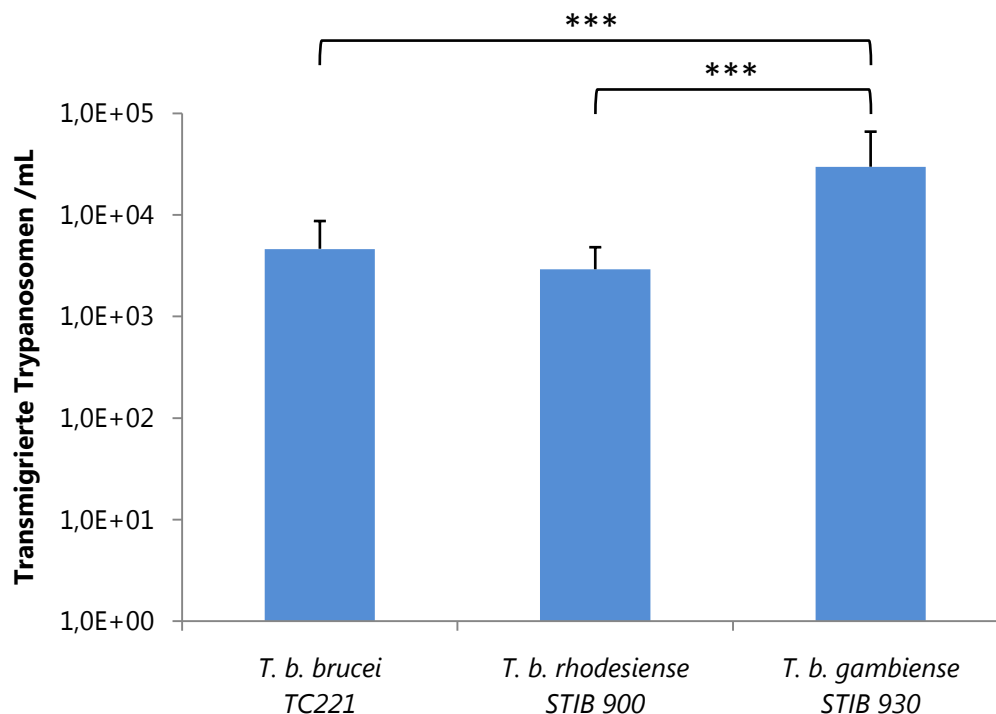


**Abb. 4.13:** Transmigration afrikanischer Trypanosomen über das ECV304-C6 BHS-Modell

Die Trypanosomen wurden mit einem Inokulum von  $10^6$  (blau) oder  $10^7$  (dunkelblau) pro BHS-Einsatz inkubiert. Nach 6 h wurde die Anzahl transmigrierter Trypanosomen bestimmt. Bei einem Inokulum von  $10^6$  Trypanosomen pro BHS Einsatz zeigten *T. b. brucei* und *T. b. rhodesiense* ähnliche Transmigrationsraten. *T. b. gambiense* transmigrierte am stärksten. Die Erhöhung des Inokulums auf  $10^7$  Trypanosomen pro BHS-Einsatz führte zu einer signifikanten Erhöhung der Transmigration im Fall von *T. b. brucei* und *T. b. rhodesiense*. Die Transmigrationsrate von *T. b. gambiense* stieg nicht signifikant an. Die Sternchen zeigen die  $p$ -Werte an: \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$  (t-Test).

Trypanosomen /mL  $+1,32 \cdot 10^4$  ( $p \leq 0,001$ , t-Test). Durch die Erhöhung des Inokulums auf  $10^7$  Trypanosomen pro BHS-Einsatz stiegen die Transmigrationsraten von *T. b. brucei* TC221 und *T. b. rhodesiense* STIB900 signifikant an ( $p \leq 0,05$ ; t-Test) (**Abb. 4.13**). *T. b. brucei* TC221 transmigrierte mit  $2,55 \cdot 10^4$  Trypanosomen /mL  $+1,89 \cdot 10^4$  und *T. b. rhodesiense* STIB900 mit  $1,97 \cdot 10^4$  Trypanosomen /mL  $+1,76 \cdot 10^4$ . Das erhöhte Inokulum ergab im Fall von *T. b. gambiense* STIB930 nur eine minimale Erhöhung der Transmigrationsrate auf  $2,09 \cdot 10^4$  Trypanosomen /mL  $+1,03 \cdot 10^4$ .

Zur Beantwortung der Frage, ob Trypanosomen auch von der ZNS-Seite auf die Blutstromseite der ECV304-C6 BHS gelangen können, wurde die Anordnung der Zellen im ECV304-C6 Modell invertiert (BHS<sub>i</sub>), so dass die Gliazellen innerhalb des Transwelleinsatzes und die ECV304-Zellen auf der äußeren Seite des Einsatzes kultiviert wurden. Bei einem Inokulum von  $10^6$  Trypanosomen /mL transmigrierte *T. b. gambiense* STIB930 mit  $2,97 \cdot 10^4$  Trypanosomen /mL  $+3,61 \cdot 10^4$  signifikant höher ( $p \leq 0,001$ , t-Test) als *T. b. rhodesiense* STIB900 mit  $2,91 \cdot 10^3$  Trypanosomen /mL  $+1,88 \cdot 10^3$  und *T. b. brucei* TC221 mit  $4,62 \cdot 10^3$  Trypanosomen /mL  $+4,06 \cdot 10^3$  (**Abb. 4.14**).



**Abb. 4.14:** Transmigration afrikanischer Trypanosomen über das inverse ECV304-C6 BHS-Modell

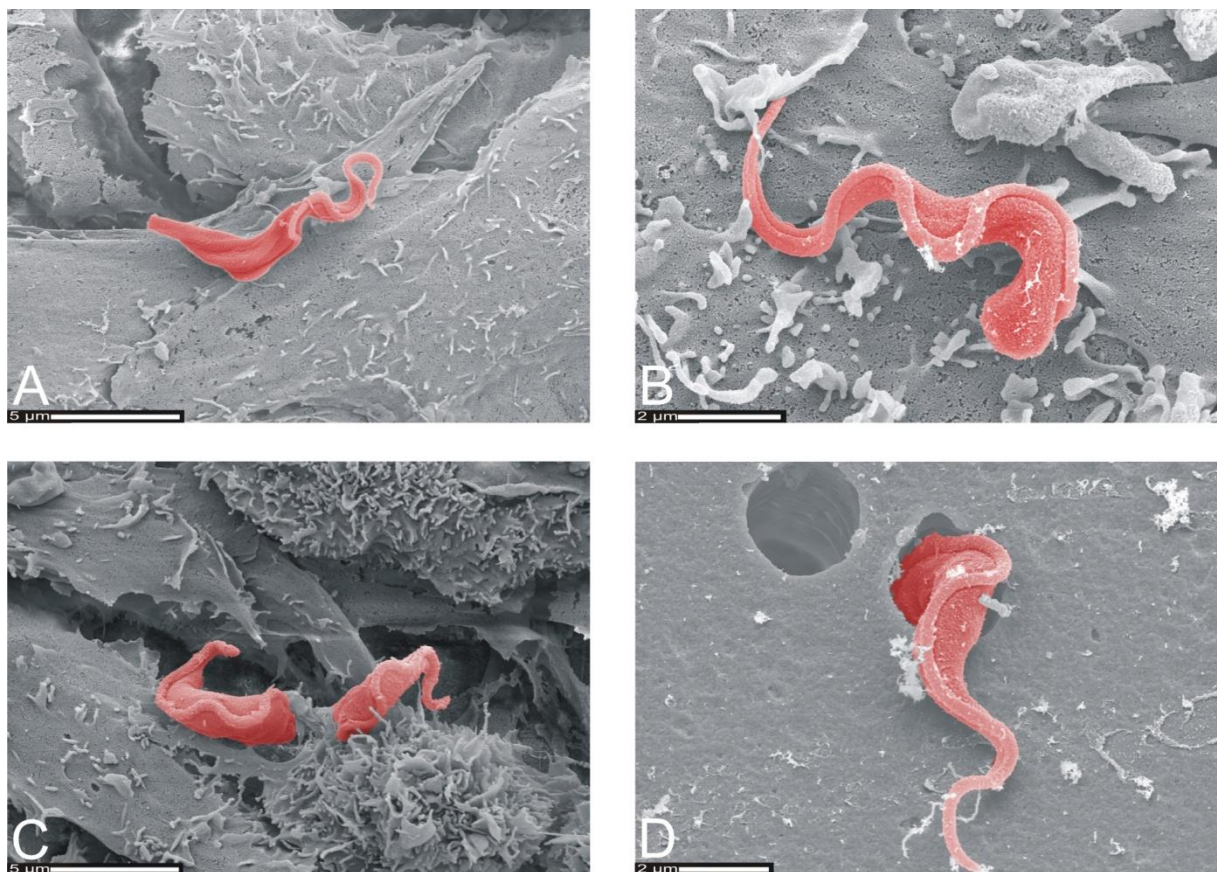
Trypanosomen wurden mit einem Inokulum von  $10^6$  (blau) pro BHS<sub>i</sub>-Einsatz inkubiert. Nach 6 h wurden die transmigrierten Trypanosomen gezählt. *T. b. gambiense* transmigrierte signifikant stärker die BHS<sub>i</sub> als *T. b. brucei* und *T. b. rhodesiense*, die ähnliche Transmigrationsraten aufwiesen. Die Sternchen zeigen die  $p$ -Werte an: \*\*\*=  $p \leq 0,001$  (t-Test).

Die Transmigrationsuntersuchungen ergaben, dass sowohl humanpathogene Trypanosomen wie *T. b. gambiense* STIB930 und *T. b. rhodesiense* STIB900 als auch die tierpathogene Trypanosomenart *T. b. brucei* TC221 die ECV304-C6 BHS bidirektional überwinden können.

#### 4.2.2.2 Rasterelektronenmikroskopie der Trypanosomalen Transmigration

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. M. Rohde am HZI in Braunschweig wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von mit Trypanosomen infizierten ECV304-C6 BHS-Transwelleinsätzen angefertigt. Für die Fixierung wurden infizierte Transwelleinsätze aus den Transmigrationsversuchen verwendet. Weiterhin wurden unbeschichtete Transwelleinsätze ohne BHS-Zellen für Transmigrationsversuche mit *T. b. brucei* TC221 und nach 6 h Inkubation fixiert. Die vollständige Fixierung und weitere Bearbeitung erfolgte am HZI.

In den ersten beiden Abbildungen erkennt man ein *T. b. gambiense* STIB930 Trypanosom auf ECV304-Zellen. Unterhalb der Trypanosomen lassen sich Zellgrenzen erkennen (**Abb. 4.15A**



**Abb. 4.15:** REM-Darstellung von Trypanosomen in Transwelleinsätzen

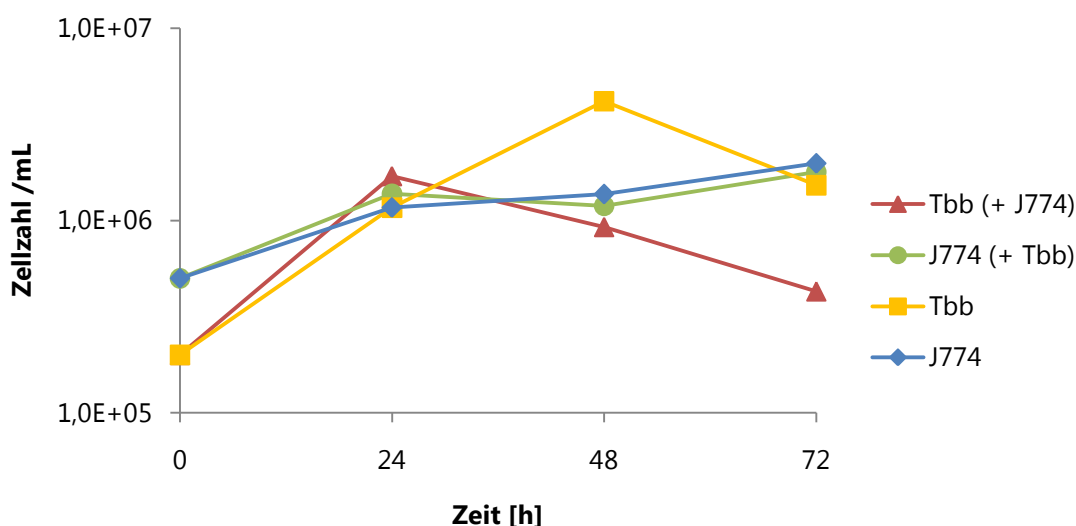
Die Bilder A und B (**A, B**) zeigen *T. b. gambiense* STIB930 auf der ECV304 Seite einer ECV304-C6 BHS. In Bild C (**C**) erkennt man *T. b. brucei* TC221 auf der ECV304 Seite einer ECV304-C6 BHS. Bild D (**D**) zeigt *T. b. gambiense* STIB930 in einer 3 µm großen Pore einer Transwelleinsatzmembran. Die Trypanosomen assoziierten mit den Zellgrenzen (**A, B, C**) und konnten Membranporen mit 3 µm Durchmesser transmigrieren (**D**). Aufnahmen von Prof. Dr. M. Rohde, eigene Kolorierung in Adobe Photoshop 7.

und **B**). Bei den BHS-Einsätzen mit *T. b. brucei* TC221 erkennt man ebenfalls Trypanosomen an den Zellgrenzen der ECV304-Zellen (**Abb. 4.15C**). Die unbeschichteten Transwelleinsätze ohne BHS-Zellen haben eine Membranporengröße von 3  $\mu\text{m}$  und die TC221-Trypanosomen passen durch diese Poren hindurch. In der Abbildung erkennt man ein Trypanosom in einer der Membranporen (**Abb. 4.15D**). Die Bilder wurden in Adobe PS7 nachträglich bearbeitet und die Trypanosomen wurden rot eingefärbt.

### 4.2.3 KOKULTUR VON MAKROPHAGEN UND TRYPANOSOMEN

Makrophagen sind Zellen des Immunsystems und in der Lage die Blutgefäße zu verlassen, um zu Entzündungsherden vorzustoßen. In dieser Arbeit wurde getestet, ob J774-Makrophagen die ECV304-C6 BHS überwinden können und ob dieser Vorgang einen Einfluss auf die trypanosomale Transmigration hat. In Kokultivierungsversuchen wurde zunächst untersucht, ob es eine transmigrationsunabhängige Wechselwirkung zwischen Makrophagen und Trypanosomen, beispielsweise eine trypanozide Wirkung der Makrophagen, gibt.

Zu je  $5,0 \cdot 10^5$  Makrophagen wurden  $2,0 \cdot 10^5$  Trypanosomen gegeben und für 72 h in Makrophagenkulturmedium inkubiert (**Abb. 4.16**). Als Kontrollen wurden die Trypanosomen und die Makrophagen in ihren jeweiligen Standardmedien kultiviert. Nach 24 h lag in allen Ansätzen die Zellzahl über  $1,0 \cdot 10^6$  Zellen /mL. Die Werte der gezählten Makrophagen blieben bis zum 72 h Wert annähernd konstant bei  $1,0 \cdot 10^6$  Zellen /mL. In der Kokultur fiel die Trypanosomenkonzentration bei den 48 und 72 h Werten leicht auf  $4,28 \cdot 10^5$  Trypanosomen /mL  $+1,01 \cdot 10^5$  ab, während sich die Trypanosomen in ihrem Standardmedium bis zum 48 h Wert noch auf  $4,18 \cdot 10^6$  Trypanosomen /mL  $+3,42 \cdot 10^5$  vermehrten und danach abstarben.



**Abb. 4.16:** Wachstumsverlauf von Ko- und Einzelkultur von *T. b. brucei* TC221 und J774-Makrophagen

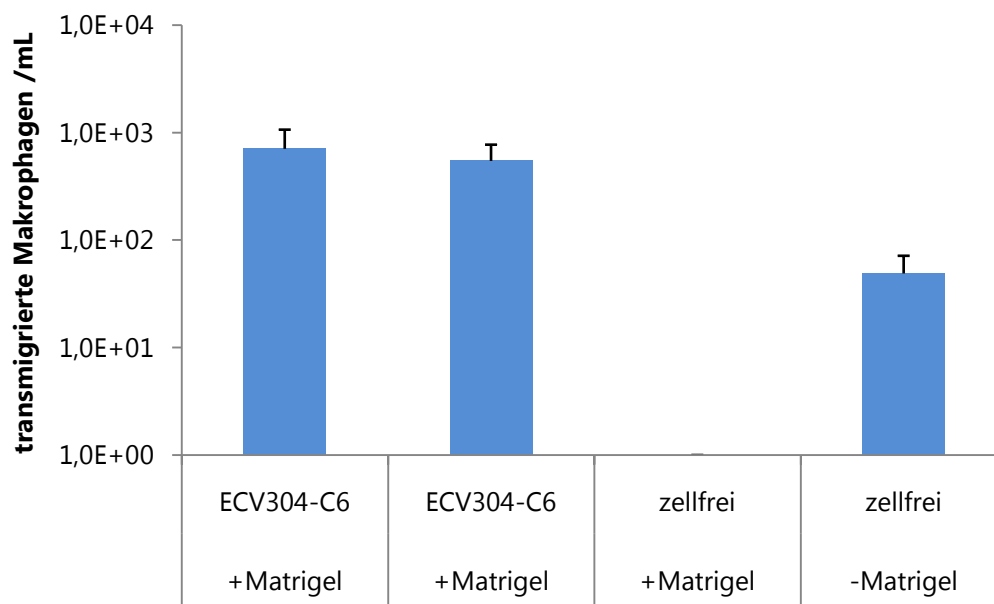
In der Kokultur wurden *T. b. brucei* TC221 (**Tbb+J774**) und J774-Makrophagen (**J774+Tbb**) zusammen kultiviert, jedoch getrennt voneinander gezählt. Parallel dazu wurden Trypanosomen (**Tbb**) und Makrophagen (**J774**) in ihren jeweiligen Standardmedien kultiviert. Ausgehend von ihren Inokuli stiegen die Zellzahlen für Trypanosomen und Makrophagen beim 24 h Wert an und lagen bei  $1,0 \cdot 10^6$  Zellen/ mL. Die Anzahl der Makrophagen blieb beim 48 und 72 h Wert nahezu konstant. Die Anzahl der Trypanosomen in der Kokultur sankt beim 48 und 72 h Wert jeweils leicht ab, während die Trypanosomen sich in ihrem Standardmedium bis zum 48 h Wert noch stark vermehrten und danach abstarben. Für eine bessere Übersicht des Verlaufs wurden die einzelnen Messpunkte linear verbunden. Werte und Standardabweichung siehe Tab. 6.3 im Anhang S. 172.

Die Kokulturversuche von Trypanosomen und Makrophagen haben ergeben, dass sich beide innerhalb der ersten 24 h nicht gegenseitig negativ beeinflussten und Vermehrungsraten zeigen, wie sie sie auch in Monokultur erreichen. Diese Erkenntnisse sind wichtig für die nachfolgenden Kotransmigrationsversuche.

#### 4.2.4 MAKROPHAGEN VERRINGERN TRYPANOSOMALE TRANSMIGRATION

Um den Einfluss von Makrophagen auf die trypanosomale Transmigration im ECV304-C6 BHS-Modell zu untersuchen, wurde zunächst die Transmigration der Makrophagen ohne Trypanosomen untersucht. In weiteren Versuchen wurden Experimente zur Kotransmigration von Makrophagen und *T. b. brucei* TC221 durchgeführt.

Für die Transmigrationsuntersuchungen von J774-Makrophagen ohne Trypanosomen wurden neben ECV304-C6 BHS-Einsätzen auch zellfreie Transwelleinsätze mit und ohne Matrigel verwendet. Da sich die Makrophagen in aktiviertem Zustand möglicherweise anders verhalten, wurde auch das Transmigrationsverhalten von Phorbolmyristatacetat (PMA) aktivierten Makrophagen untersucht. Mit einem Inokulum von  $10^5$  J774-Makrophagen pro BHS-Einsatz wurde die optimierte ECV304-C6 BHS für 5 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die transmigrierten Makrophagen gezählt (**Abb. 4.17**). Die J774-Makrophagen transmigrierten mit  $7,1 \cdot 10^2$  Zellen /mL  $+3,6 \cdot 10^2$  und die PMA-aktivierten Makrophagen mit  $5,47 \cdot 10^2$  Zellen /mL  $+2,28 \cdot 10^2$ . Zellfreie Transwelleinsätze mit einer Beschichtung aus Matrigel im Inneren des Einsatzes wurden von den Makrophagen nicht transmigriert. Fehlten die BHS-Zellen und das Matrigel in den Transwelleinsätzen, transmigrierten die Makrophagen

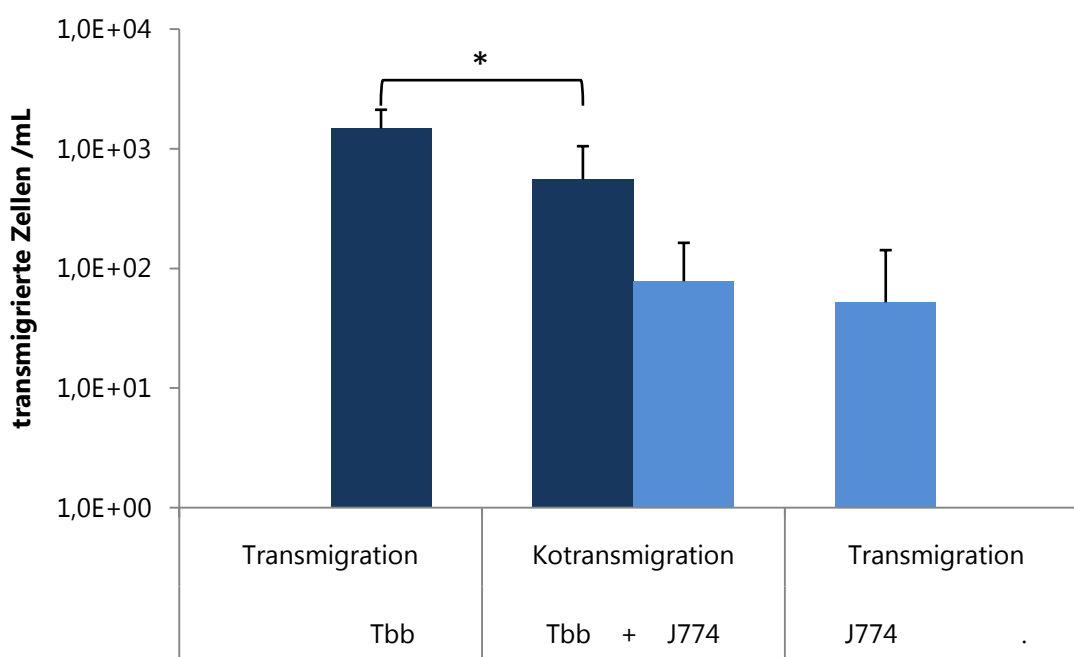


**Abb. 4.17:** Transmigration von J774-Makrophagen

Murine J774-Makrophagen wurden mit einem Inokulum von  $10^5$  Zellen pro Transwelleinsatz inkubiert. Nach 5 h wurde die Anzahl transmigrierte Makrophagen bestimmt. Bei der Transmigration über die optimierte ECV304-C6 BHS wurde zwischen PMA-aktivierten (**+PMA**) und unaktivierten Makrophagen (**-PMA**) unterschieden. Die Aktivierung hatte keinen Einfluss auf die Transmigrationsrate. Im Gegensatz zu zellfreien Transwelleinsätzen mit Matrigel wurden solche ohne Matrigel nicht von J774-Makrophagen transmigriert.

mit  $4,90 \cdot 10^1$  Zellen /mL +  $2,26 \cdot 10^1$  (**Abb. 4.17**). Die Untersuchungen zur Transmigration von Makrophagen über die ECV304-C6 BHS ergaben, dass J774-Makrophagen das BHS-Modell überwinden können und dass die Aktivierung der Makrophagen keine Auswirkung auf die Transmigrationsrate hat.

Für die Untersuchung der Kotransmigration wurden pro ECV304-C6 BHS-Einsatz  $1 \cdot 10^6$  J774-Makrophagen und TC221-Trypanosomen eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 h wurde die Anzahl transmigrierter Trypanosomen und Makrophagen getrennt voneinander bestimmt. In Kontrollversuchen wurde parallel zu der Kotransmigration auch die Transmigration von Makrophagen und Trypanosomen getrennt voneinander untersucht (**Abb. 4.18**). *T. b. brucei* TC221 transmigrierte ohne Makrophagen mit einer Rate von  $1,48 \cdot 10^3$  Trypanosomen /mL +  $6,42 \cdot 10^2$ . In Gegenwart der J774-Makrophagen verringerte sich die Transmigrationsrate signifikant auf  $5,56 \cdot 10^2$  Trypanosomen /mL +  $4,97 \cdot 10^2$  ( $p \leq 0,05$ ; t-Test). Die Transmigrationsrate der Makrophagen veränderte sich nur unwesentlich von  $5,21 \cdot 10^2$  Zellen /mL +  $9,02 \cdot 10^1$  ohne Trypanosomen auf  $7,81 \cdot 10^1$  Zellen /mL +  $8,56 \cdot 10^1$  bei der Kotransmigration.



**Abb. 4.18:** (Ko-)Transmigration von J774-Makrophagen und TC221-Trypanosomen

Die Transmigration und die Kotransmigration von **J774 (blau)** Makrophagen und *T. b. brucei* TC221 (**Tbb; dunkelblau**) wurden parallel untersucht. Hierfür wurden Inokuli von je  $10^6$  Makrophagen und Trypanosomen pro ECV304-C6 BHS Einsatz verwendet. Nach 5 h Inkubation wurden Makrophagen und Trypanosomen getrennt voneinander gezählt. Die Transmigrationsrate der Makrophagen veränderte sich in Gegenwart der Trypanosomen nicht signifikant. Hingegen sank die Transmigrationsrate der Trypanosomen in Gegenwart der Makrophagen signifikant ab. Die Sternchen zeigen die  $p$ -Werte an:  $*$  =  $p \leq 0,05$  (t-Test)

Die Untersuchungen zur Transmigration und Kotransmigration von Makrophagen und Trypanosomen haben gezeigt, dass die J774-Makrophagen die optimierte ECV304-C6 BHS überwinden können. Weiterhin zeigte sich, dass sich die Transmigration der J774-Makrophagen nicht in Gegenwart von *T. b. brucei* TC221 veränderte. In Gegenwart von J774-Makrophagen verringerte sich jedoch die trypanosomale Transmigration. Als Ursache für das Absinken der Transmigrationsrate konnte eine trypanozide Wirkung der Makrophagen ausgeschlossen werden, wie die Kokultivierung gezeigt hat.

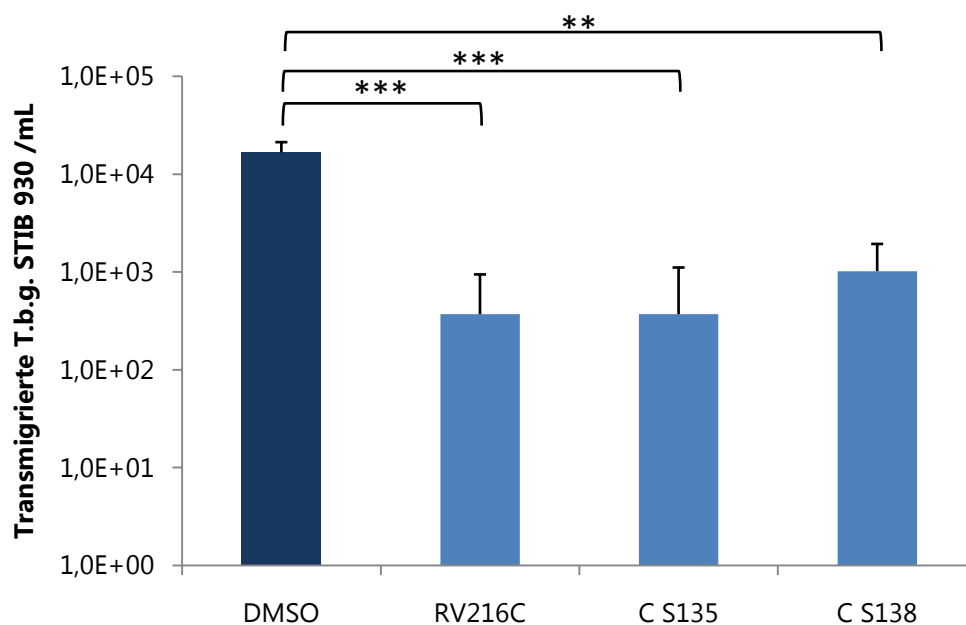
#### 4.2.5 PROTEASEINHIBITOREN VERRINGERN TRYPANOSOMALE TRANSMIGRATION

In einer Kooperation mit Prof. Dr. T. Schirmeister vom Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie an der Universität zu Würzburg wurden drei Cysteinprotease-Inhibitoren im Transmigrationsversuch mit *T. b. gambiense* STIB930 über die optimierte ECV304-C6 BHS getestet. Die Cysteinproteasen von *T. brucei* werden Brucipaine genannt und wurden als wichtiger Virulenzfaktor bei der Transmigration über die BHS identifiziert (Nikolskaia *et al.*, 2006a). Der Stamm *T. b. gambiense* STIB930 wurde gewählt, da er die stärkste Transmigration über das optimierte ECV304-C6 BHS-Modell zeigte.

Die Substanzen wurden von Frau Caroline Schad, Doktorandin bei Frau Prof. Dr. Schirmeister eingewogen und versendet. Die Einwaage der Substanzen wurden nach Rücksprache so gewählt, dass die Endkonzentration der Inhibitoren im Infektionsmedium eine möglichst gute inhibitorische Wirkung auf die Brucipaine hat aber nicht zu toxisch für die Trypanosomen ist. Die Inhibitoren wurden mit je zu  $10^6$  STIB930 Trypanosomen auf die ECV304-C6 BHS gegeben. Nach 6 h Inkubation wurden die Anzahl der transmigrierten Trypanosomen bestimmt (**Abb. 4.19**). In dem Versuch mit dem Inhibitor RV216C in einer Endkonzentration von  $405 \mu\text{g} / \text{mL}$  wurden  $3,70 \cdot 10^2$  Trypanosomen /mL  $+4,53 \cdot 10^3$  und in dem Versuch mit dem Inhibitor CS135 in einer Endkonzentration von  $241 \mu\text{g} / \text{mL}$  wurden  $3,70 \cdot 10^2$  Trypanosomen /mL  $+7,40 \cdot 10^2$  gezählt. Unter Einfluss des Inhibitors CS138 in einer Endkonzentration von  $197 \mu\text{g} / \text{mL}$  wurden  $1,02 \cdot 10^3$  Trypanosomen /mL  $+9,15 \cdot 10^2$  gezählt. Da die Inhibitoren in DMSO gelöst waren, wurde auch der Einfluss von DMSO auf die Transmigration untersucht. Die Transmigrationsrate von *T. b. gambiense* STIB930 mit DMSO betrug  $1,67 \cdot 10^4$  Trypanosomen /mL  $+4,53 \cdot 10^3$  und war damit sigifikant von den Ansätzen mit den Inhibitoren verschieden. Nach Ablauf der sechs Stunden Inkubationszeit waren innerhalb der BHS-Einsätze im



Gegensatz zur DMSO-Kontrolle keine lebenden Trypanosomen mehr zu erkennen. DMSO hat keinen Einfluss auf die Transmigration von *T. b. gambiense* STIB930, da die Anzahl der transmigrierten Trypanosomen unter DMSO-Einfluss einen ähnlichen Wert erreichen wie ohne DMSO (**Abb. 4.13**).



**Abb. 4.19:** Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die trypanosomale Transmigration

Die Inhibitoren wurden in DMSO gelöst, in Zellkulturmedium verdünnt und zu  $10^6$  *T. b. gambiense* STIB930 pro ECV304-C6 BHS gegeben. Nach 6 h Inkubation wurde die Anzahl der transmigrierten Trypanosomen bestimmt. Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle transmigrierten unter dem Einfluss der drei Inhibitoren signifikant weniger Trypanosomen. Die Sternchen zeigen die  $p$ -Werte an: \*\*=  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*=  $p \leq 0,001$  (t-Test)

Die Verwendung der Brucipain Inhibitoren führte zu einer signifikanten Verringerung der Transmigration von *T. b. gambiense* STIB930 über die optimierte ECV304-C6 BHS.

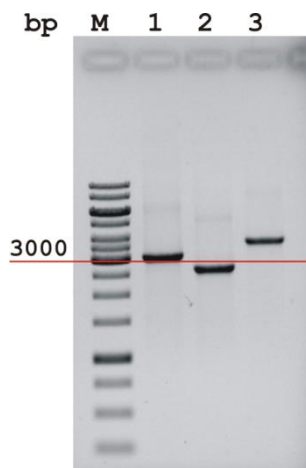
## 4.3 STREPTOKOKKEN

Zahlreiche Streptokokkenarten sind Kommensalen und opportunistische Krankheitserreger beim Menschen. Einige Arten können invasive Erkrankungen hervorrufen und auch die BHS überwinden. Die Folge sind lebensbedrohliche Meningitiden (Patterson *et al.*, 1992). In dieser Arbeit wurden verschiedene Streptokokkenstämme, vor allem klinische Isolate, für Transmigrationsuntersuchungen über das ECV304-C6 BHS-Modell und über das HBMEC BHS-Modell verwendet. Der Hauptvirulenzfaktor der Pneumokokken ist die Kapsel (Austrian, 1981) und daher wurde mit Hilfe von Kapselmutanten die Rolle der Kapsel bei der Transmigration über die BHS untersucht.

### 4.3.1 KAPSELDELETION IN KLINISCHEN ISOLATEN

In dieser Arbeit wurde der Effekt der Kapsel auf die Transmigration über das ECV304-C6 BHS-Modell und über das HBMEC BHS-Modell untersucht. Für diese Versuche wurden klinische Isolate der Serogruppe 7F herangezogen und für die Insertions-Deletions-Mutagenese verwendet. Die natürliche Kompetenz der Pneumokokken wurde ausgenutzt, um den Kapsellokus im Genom durch eine Kanamycinresistenzgenkassette zu ersetzen. Diese Kassette ist von Genbereichen flankiert, die homolog zu den Grenzen des Kapsellokus sind, so dass dieses Fragment (Kan-Kassette) über homologe Rekombination ins Genom integrieren kann. Die erfolgreiche Transformation wurde durch das Vorhandensein der Kan-Kassette im Genom mittels spezifischer PCR-Amplifikation und Southern Blot nachgewiesen sowie durch die Analyse des Wachstums in kanamycinhaltigen Medien überprüft.

Im ersten Schritt wurde die Kan-Kassette aus dem Genom der Stämme TIGR4  $\Delta cps$  und D39  $\Delta cps$  amplifiziert. Hierfür wurde die genomische DNA aus diesen Stämmen nach der CTAB-Methode isoliert. Die nachfolgende Abbildung zeigt die amplifizierten PCR-Fragmente nach der Aufreinigung (**Abb. 4.20**). Die Amplifikation der Kan-Kassette war mit drei der vier Primerkombinationen möglich. Insgesamt wurden die Serotyp 7F Stämme „SPN 277, 282, 289“ und „290“ für die Transformationsversuche verwendet. Bei der Untersuchung der potentiellen Mutanten stellte sich heraus, dass für die Selektion der verwendeten klinischen Isolate teilweise eine bis zu achtfach höhere Kanamycinkonzentration im Vergleich zum Laborstamm Serotyp 35A „SPN 37“ eingesetzt werden musste. Da das Gen für die Kanamycinresistenz auch eine Resistenz gegen Neomycin vermittelt, wurde die Kombination von Kanamycin und Neomycin standardmäßig in einer Konzentration von jeweils 125 µg /mL



**Abb. 4.20:** Amplifikation und Aufreinigung der Kan-Kassette

Die Amplifikation der Kan-Kassette war mit drei Primerkombinationen erfolgreich. Die PCR-Produkte wurden anschließend aufgereinigt. Das Foto zeigt die PCR-Produkte nach der Aufreinigung.

**M**= Marker (quick load 1 kb ladder)

Primerkombinationen und PCR-Fragmentlängen:

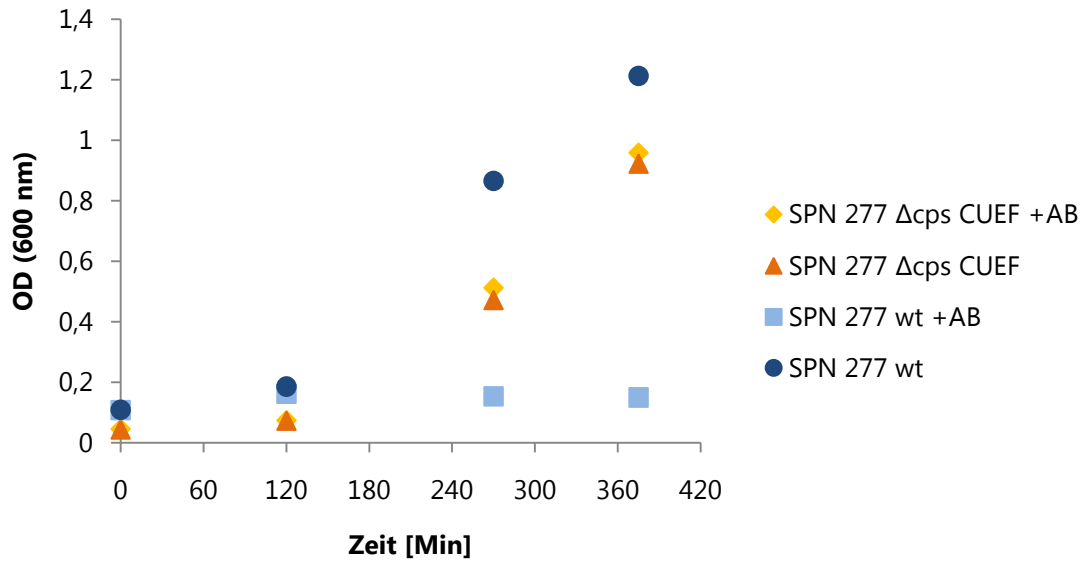
**1**= SBdexBf1 + SBaliAr1 (3237 bp)

**2**= SBdexBf2 + SBaliAr1 (4335 bp)

**4**= SBdexBf2 + SBaliAr2 (3846 bp)

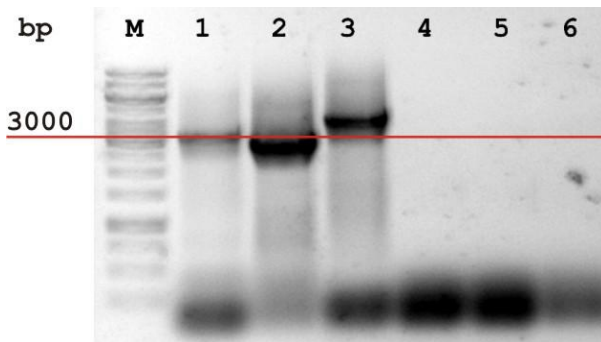
eingesetzt. Für die erfolgreiche Transformation von Serotyp 7F „SPN 277“ wurden 2,5 µL CSP-1 und 5 µL des Fragments mit der Kan-Kassette aus dem Serotyp 4 Stamm TIGR4  $\Delta cps$  bei einer  $OD_{600\text{ nm}}=0,107$  zugegeben. Die daraus erhaltene Kapselmutante „SPN 277“  $\Delta cps$  „CUEF“ wächst auf Kanamycin/Neomycin-haltigen Agarplatten und zeigt einen „rauen“ Phänotyp. In Flüssigkultur mit THY unter Zusatz von Kanamycin/Neomycin wächst „SPN 277“  $\Delta cps$  „CUEF“ ebenfalls (**Abb. 4.21**). Der Wildtyp Serotyp 7F „SPN 277“ erreicht nach 6 h eine  $OD_{600\text{ nm}}$  von 1,21. Die Kapselmutante erreicht mit Antibiotikazusatz eine  $OD_{600\text{ nm}}$  von 0,959 und ohne Antibiotikazusatz eine  $OD_{600\text{ nm}}$  von 0,923. Im Vergleich dazu hat der Wildtyp nach 6 h immer noch eine  $OD_{600\text{ nm}}$  von 0,150. Aus der „SPN 277“  $\Delta cps$  „CUEF“ Mutante wurde die genomische DNA isoliert und mittels PCR wurde die Kan-Kassette amplifiziert (**Abb. 4.22**).

Im Southern Blot konnte die Insertion der Kan-Kassette ebenfalls nachgewiesen werden (**Abb. 4.23**). *Hind*III verdauete genomische DNA der Wildtypen und Kapselmutanten wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Fragment, das einen bestimmten Randbereich des Kapsellokus enthält, wurde mittels einer spezifischen Sonde nachgewiesen. Die Southern Blot Sonde erkannte sowohl bei der wildtypischen DNA als auch bei der DNA der Kapselmutanten ein bestimmtes Fragment, das bei den Kapselmutanten kleiner ist als bei den wildtypischen Stämmen. Diese Bandenverschiebung erklärt sich durch den Austausch eines Teilbereichs des Kapsellokus durch das kleinere Fragment der Kan-Kassette. Dieser Versuch belegt auf der Ebene der genomischen DNA die Deletion der Kapselgenregion bei „SPN 277“  $\Delta cps$  „CUEF“.



**Abb. 4.21:** Wachstum der Stämme Serotyp 7F „SPN 277“ und „SPN 277“  $\Delta$ cps „CUEF“ mit und ohne Kanamycin

Das Serotyp 7F klinische Pneumokokkenisolat „SPN 277“ erreichte in THY ohne Kanamycin (**blaue Punkte**) nach ca. 6 h eine  $OD_{600\text{ nm}}$  von über 1,2. In THY mit Kanamycin (**hellblaue Quadrate**) erfolgte kein Wachstum. Die kapseldeletierte Mutante „SPN 277“  $\Delta$ cps „CUEF“ trägt ein Kanamycinresistenzgen und vermehrte sich in THY sowohl mit Kanamycin (**gelbe Rauten**) als auch ohne Kanamycin (**orangefarbene Dreiecke**) innerhalb von ca. 6 h bis zu einer  $OD_{600\text{ nm}}$  von ca. 1,0.



**Abb. 4.22:** Amplifikation der Kan-Kassette

Die Kan-Kassette wurde erfolgreich mittels PCR aus dem Genom von „SPN 277“  $\Delta$ cps „CUEF“ amplifiziert (**Spur 1-3**). Aus dem Genom von Serotyp 7F „SPN 277“ konnte keine Kan-Kassette amplifiziert werden (**Spur 4-6**).

**M**= Marker (gene ruler 1 kb ladder)

Primerkombinationen:

**1, 4**= SBdexBf1 + SBaliAr1 (3237 bp)

**2, 5**= SBdexBf1 + SBaliAr2 (2748 bp)

**3, 6**= SBdexBf2 + SBaliAr2 (3846 bp)



**Abb. 4.23:** Nachweis der Kanamycinresistenzgenkassete im Southernblot

Die Spuren 1 und 2 enthalten DNA-Fragmente des Serotyp 7F Stammes „SPN 277“ (1) sowie die eigens erzeugte Kapselmutante „SPN 277 CUEF“ (2). Die Spuren 3 und 4 enthalten DNA-Fragmente des Serotyp 2 Stammes „SPN D39“ (3) und dessen Kapselmutante (4). *Hind*III verdaute genomische DNA der Kapselmutanten und der Wildtypen wurde aufgetrennt und geblottet. Die Sonde detektierte eine Sequenz, die den Kapsellokus flankiert. Wird der Kapsellokus durch die Kan-Kassette ersetzt, wird das Fragment kleiner. Die Bandenverschiebung in Spur 1 und 2 belegte die Kapseldeletion bei dem Serotyp 7F Stamm SPN 277.

Die Kapsel des Serotyp 7F klinischen Patientenisolats „SPN 277“ konnte erfolgreich deletiert werden. Die erhaltene Kapselmutante „SPN 277“  $\Delta cps$  „CUEF“ wurde in weiteren Versuchen bezüglich ihres Transmigrationsverhaltens mit dem ECV304-C6 und dem HBMEC BHS-Modell charakterisiert.

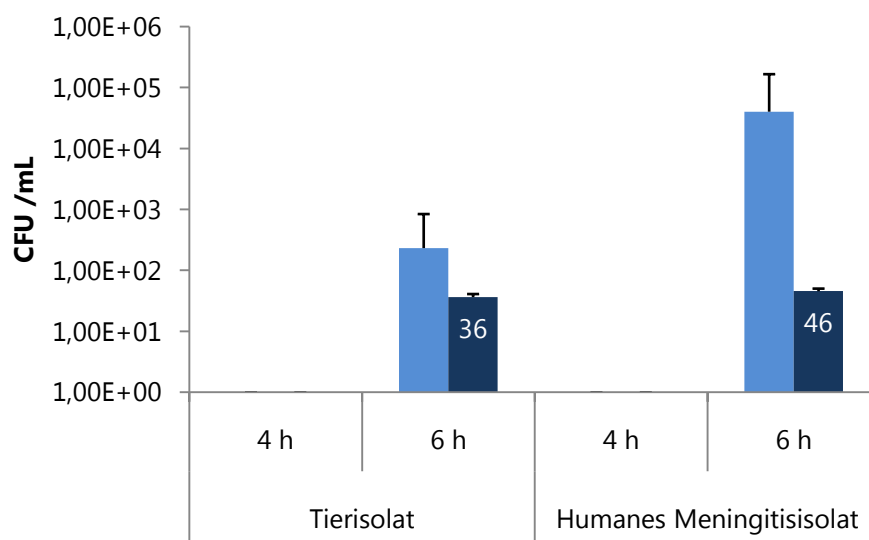
### 4.3.2 TRANSMIGRATION ÜBER DIE ECV304-C6 BHS

Nach der erfolgreichen Anwendung des optimierten ECV304-C6 BHS-Modells bei der Untersuchung der trypanosomalen Transmigration wurden in weiteren Experimenten unterschiedliche Streptokokkenarten auf ihr Transmigrationsverhalten über die optimierte ECV304-C6 BHS untersucht.

#### 4.3.2.1 Transmigration von *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*

*S. equi* ssp. *zooepidemicus* gehört zu den Gruppe C Streptokokken und verursacht Infektionserkrankungen des Respirationstraktes z. B. bei Pferden. In seltenen Fällen können die Streptokokken auf den Menschen übertragen werden und gefährliche invasive Erkrankungen wie eine Meningitis auslösen.

Dr. Markus Fulde, HZI Braunschweig stellte ein Tierisolat und ein Humanisolat aus einem Meningitispatienten zur Verfügung. Die Streptokokken wurden mit einem Inokulum von  $10^5$  Bakterien pro BHS-Einsatz für vier und sechs Stunden inkubiert. Die Auswertung der CFU ergab, dass nach vier Stunden keine transmigrierten Streptokokken nachzuweisen waren (**Abb. 4.24**). Nach sechs Stunden transmigrierten  $2,23 \cdot 10^2$  CFU /mL  $+ 6,08 \cdot 10^2$  des Tierisolats und  $4,01 \cdot 10^4$  CFU /mL  $+ 1,25 \cdot 10^5$  des Humanisolats. Neben der höheren Transmigrationsrate des humanen Meningitisisolats ist auch die Transmigrationshäufigkeit mit 46 % gegenüber dem Tierisolat mit 36 % erhöht.



**Abb. 4.24:** Transmigration von *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* über die ECV304-C6 BHS

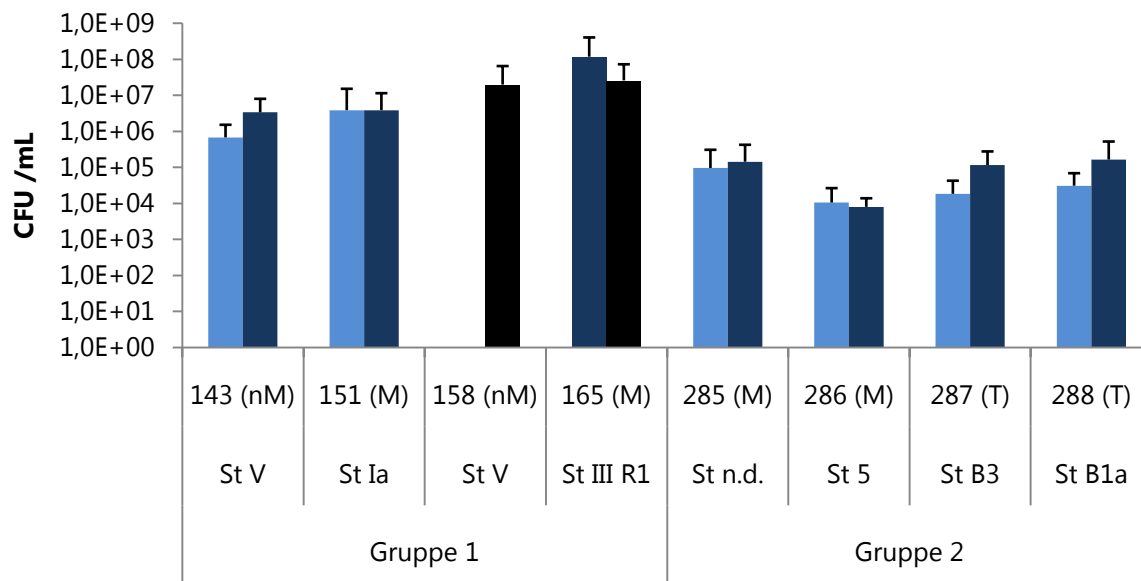
Dargestellt ist die Transmigrationsrate (**blau**) und die Transmigrationshäufigkeit (**dunkelblau**) mit der Angabe des Prozentwertes. ECV304-C6 BHS-Einsätze wurden mit einem Inokulum von  $10^5$  Bakterien pro BHS-Einsatz inkubiert. Nach vier und sechs Stunden wurde die CFU /mL transmigrierter Bakterien bestimmt. Nach vier Stunden war noch keine Transmigration feststellbar. Nach sechs Stunden transmigrierte das humane Meningitisisolat stärker und zeigte eine höhere Transmigrationshäufigkeit als das Tierisolat. ( $p \leq 0,16$ ; t-Test)

#### 4.3.2.2 Transmigration von *Streptococcus agalactiae*

*S. agalactiae* oder auch Gruppe B Streptokokken (GBS) können von der Mutter auf das Kind übertragen werden und sind besonders für Meningitisfälle bei Neugeborenen bekannt. Als potentielle ZNS-Invasoren wurden in dieser Arbeit GBS-Isolate von Meningitispatienten, GBS-Isolate von Patienten ohne Meningitis sowie GBS-Isolate von asymptomatischen Trägern in Transmigrationsversuchen über die ECV304-C6 BHS untersucht.

Für Transmigrationsuntersuchungen wurden acht verschiedene Stämme von *S. agalactiae* herangezogen. Vier Stämme (Gruppe 1) wurden aus der Stammsammlung von Prof. Dr. Dr. G. S. Chhatwal von der Abteilung Medizinische Mikrobiologie am HZI in Braunschweig zur Verfügung gestellt. Zwei dieser Stämme sind Isolate aus Meningitispatienten (Serotyp Ia GBS Nr. 151 und Serotyp IIIR1 GBS Nr. 165) und die anderen beiden Isolate stammen aus Patienten, die keine Meningitis entwickelten (Serotyp V GBS Nr. 143 und Serotyp V GBS Nr. 158). Die anderen vier Stämme (Gruppe 2) stammen von Dr. M. van der Linden vom Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für Streptokokken in Aachen. Es handelt sich um neue klinische Isolate von Patienten oder Trägern mit bekanntem Hintergrund. Zwei der Stämme sind ebenfalls aus Meningitispatienten isoliert worden (Serotyp unbekannt GBS Nr. 285 und Serotyp 5 GBS Nr. 286) und zwei stammen von Vaginaabstrichen asymptomatischer Trägerinnen (Serotyp B3 GBS Nr. 287 und Serotyp B1a GBS Nr. 288). Die acht GBS-Isolate wurden in Transmigrationsversuchen über die optimierte ECV304-C6 BHS mit einer Inkubationszeit von 6 h und mit Inokuli von  $10^4$  und  $10^5$  GBS /BHS-Einsatz untersucht.

Innerhalb der Gruppe 1 transmigrierte „GBS 143“ bei einem Inokulum von  $10^4$  GBS /BHS-Einsatz mit  $6,78 \cdot 10^5$  CFU /mL  $+8,42 \cdot 10^5$  und bei einem Inokulum von  $10^5$  GBS /BHS-Einsatz mit  $3,38 \cdot 10^6$  CFU /mL  $+4,60 \cdot 10^6$  (**Abb. 4.25**). Bei „GBS 151“ zeigten sich keine Unterschiede in der Transmigration zwischen den beiden Inokuli. „GBS 151“ transmigrierte bei einem Inokulum von  $10^4$  GBS /BHS-Einsatz mit  $3,86 \cdot 10^6$  CFU /mL  $+1,13 \cdot 10^7$  und bei einem Inokulum von  $10^5$  GBS /BHS-Einsatz mit  $3,87 \cdot 10^6$  CFU /mL  $+7,57 \cdot 10^6$ . Das Meningitisisolat „GBS 158“ transmigrierte mit  $1,98 \cdot 10^7$  CFU /mL  $+4,49 \cdot 10^7$  bei einem Inokulum von  $10^6$  GBS /BHS-Einsatz. Das zweite Meningitisisolat der Gruppe 1, „GBS 165“, transmigrierte bei einem Inokulum von  $10^5$  GBS /BHS-Einsatz mit  $1,18 \cdot 10^8$  CFU /mL  $+2,85 \cdot 10^8$  und bei einem Inokulum von  $10^6$  GBS /BHS-Einsatz mit  $2,59 \cdot 10^7$  CFU /mL  $+4,66 \cdot 10^7$ . Die höheren Inokuli bei den Stämmen „GBS 158“ und „165“ resultieren daraus, dass die mittels OD-Messung eingestellten Inokuli nach der Auswertung der CFU /mL zu hohe Werte aufwiesen. Die Auswertung der



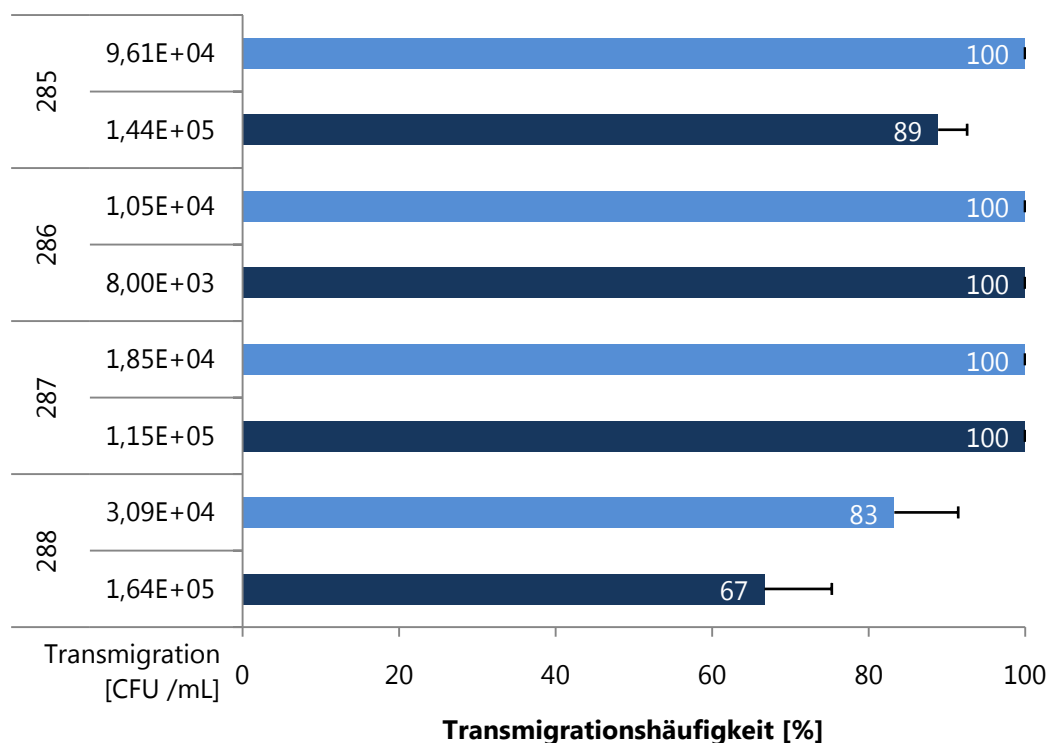
**Abb. 4.25:** Transmigration verschiedener *S. agalactiae* Isolate über die ECV304-C6 BHS

Für die Transmigrationsuntersuchungen wurden Inokuli von  $10^4$  (blau),  $10^5$  (dunkelblau) und  $10^6$  (schwarz) pro BHS-Einsatz verwendet. Nach 6 h wurde die CFU /mL der transmigrierten GBS bestimmt. Die höheren Inokuli (schwarzen Balken) resultierten daraus, dass das tatsächliche Inokulum über dem eingestellten lag. Gruppe 1 sind ältere Patientenisolates aus den USA und Gruppe 2 sind neuere Isolate vom NRZ für Streptokokken in Aachen. In jeder Gruppe befanden sich zwei Isolate aus Meningitispatienten (M), die sich in ihrer Transmigrationsrate jedoch nicht von den übrigen Isolaten unterschieden. In Gruppe 1 befanden sich zwei Isolate von Patienten ohne Meningitis (nM) und in Gruppe 2 wurden zwei Isolate aus gesunden Trägern (T) den Isolaten aus Meningitispatienten gegenüber gestellt. Unterhalb der Nr. Bezeichnung sind die Serotypen (St) aufgelistet. Bei dem Isolat 285 fehlt die Information über den Serotyp (n.d.). Die Isolate aus Gruppe 1 transmigrierten stärker als die Isolate der Gruppe 2. Die höchste Transmigrationsrate zeigte „GBS 165“, der 10.000 Mal stärker transmigrierte als „GBS 286“, der die niedrigste Rate aufwies.

Transmigrationshäufigkeit ergab für jeden Stamm 100 %, d.h. jeder BHS-Einsatz wies eine Transmigration von GBS auf.

Bei der Untersuchung der Transmigration über die ECV304-C6 BHS zeigte sich, dass die Isolate der Gruppe 2 generell weniger stark transmigrierten als die Isolate der Gruppe 1 (Abb. 4.25). Das Meningitisisolat „285“ transmigrierte bei einem Inokulum von  $10^4$  GBS /BHS-Einsatz mit  $9,61 \cdot 10^4$  CFU /mL +  $2,12 \cdot 10^5$  und bei einem Inokulum von  $10^5$  GBS /BHS-Einsatz mit  $1,44 \cdot 10^5$  CFU /mL +  $2,79 \cdot 10^5$ . Das zweite Meningitisisolat der Gruppe 2, „GBS 286“, zeigte die geringsten Transmigrationsraten von allen GBS-Isolaten. Das Isolat „286“ transmigrierte bei einem Inokulum von  $10^4$  GBS /BHS-Einsatz mit  $1,05 \cdot 10^4$  CFU /mL +  $1,60 \cdot 10^4$  und bei einem Inokulum von  $10^5$  GBS /BHS-Einsatz mit  $8,0 \cdot 10^3$  CFU /mL +  $5,88 \cdot 10^3$ . Die Trägerisolate „287“ und „288“ zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich ihrer Transmigrationsraten im Vergleich zu den Patientenisolaten. „GBS 287“ transmigrierte bei einem Inokulum von  $10^4$  GBS /BHS-Einsatz mit  $1,85 \cdot 10^4$  CFU /mL +  $2,42 \cdot 10^4$  und bei einem





**Abb. 4.26:** Transmigrationshäufigkeit verschiedener *S. agalactiae* Isolate über die ECV304-C6 BHS

Der Anteil an transmigrierten BHS-Einsätzen bezogen auf die Gesamtanzahl der BHS-Einsätze ist in Prozent dargestellt. Die absoluten Werte der Transmigration sind den Balken vorangestellt. Inokuli von  $10^4$  (blau) und  $10^5$  (dunkelblau) pro BHS-Einsatz wurden eingesetzt. Die Isolate 286 und 287 zeigten 100 % Werte, d.h. jeder BHS-Einsatz wurde transmigriert. Bei den Stämmen 285 und 288 lagen die Werte für die Transmigrationshäufigkeit bei dem höheren Inokulum unterhalb der Werte des niedrigeren Inokulums.

Inokulum von  $10^5$  GBS /BHS-Einsatz mit  $1,15 \cdot 10^5$  CFU /mL +  $1,62 \cdot 10^5$ . „GBS 288“ transmigrierte mit  $3,09 \cdot 10^4$  CFU /mL +  $3,80 \cdot 10^4$  bei einem Inokulum von  $10^4$  GBS /BHS-Einsatz und mit  $1,64 \cdot 10^5$  CFU /mL +  $3,57 \cdot 10^5$  bei einem Inokulum von  $10^5$  GBS /BHS-Einsatz. Im Gegensatz zur Gruppe 1 zeigten sich in Gruppe 2 Unterschiede in der Transmigrationshäufigkeit (**Abb. 4.26**). „GBS 285“ wies eine Transmigrationshäufigkeit von 89 % +4 bei einem Inokulum von  $10^5$  GBS /BHS-Einsatz und 100 % bei einem Inokulum von  $10^4$  GBS /BHS-Einsatz auf. Hingegen transmigrierte „GBS 288“ bei einem Inokulum von  $10^4$  GBS /BHS-Einsatz mit einer Häufigkeit von 83 % +8 und bei dem 10fach höheren Inokulum mit einer Häufigkeit von 67 % +9.

Die GBS-Patientenisolate zeigten bei Inokuli von  $10^4$  und  $10^5$  GBS /BHS-Einsatz teilweise sehr hohe Transmigrationsraten von bis zu  $1 \cdot 10^8$  CFU /mL („GBS 165“). Die hohen Transmigrationsraten gingen einher mit hohen Werten für die Transmigrationshäufigkeit, die bei sechs Stämmen für beide Inokuli bei 100 % lag. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen

Isolaten aus Meningitispatienten, nicht-Meningitispatienten und aus asymptomatischen Trägern wurden bezüglich der Transmigration über die ECV304-C6 BHS nicht festgestellt.

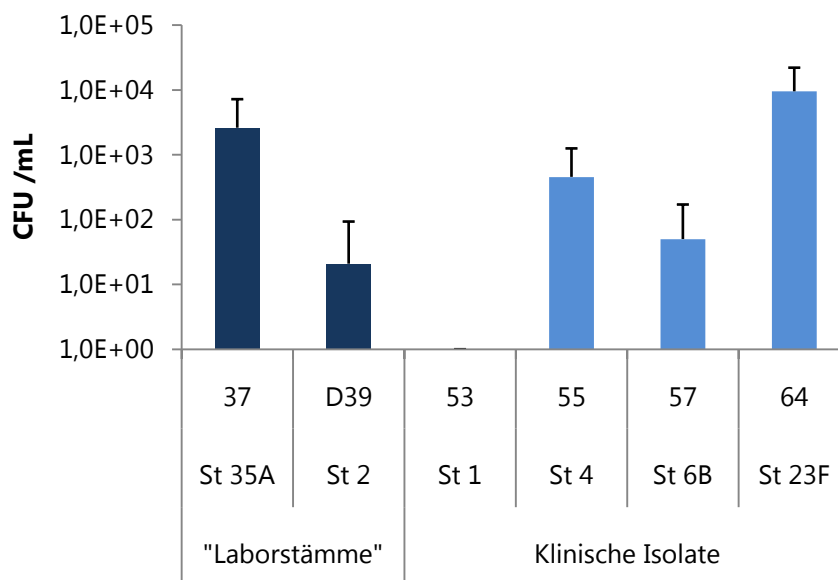
#### 4.3.2.3 Transmigration von *Streptococcus pneumoniae*

*S. pneumoniae* ist sowohl ein Kommensale der humanen Normalflora, als auch ein potentieller Meningitiserreger. Besonders bei Kleinkindern bis fünf Jahren und älteren Menschen können Pneumokokken invasive Erkrankungen auslösen und die BHS überwinden. Verschiedene klinische Isolate und Laborstämme von *S. pneumoniae*, sowie deren Kapselmutanten wurden im optimierten ECV304-C6 BHS-Modell untersucht. Zu den klinischen Isolaten gehört eine Gruppe aus vier Stämmen, von welchen zwei als „gering invasiv“ (Serotyp 1 „SPN 53“ & Serotyp 4 „SPN 55“) und zwei als „stark invasiv“ (Serotyp 6B „SPN 57“ & Serotyp 23F „SPN 64“) charakterisiert waren. Diese Gruppe wurde mit zwei „Laborstämmen“ Serotyp 35A „SPN 37“ und Serotyp 2 „SPN D39“ verglichen. Weiterhin wurden die eigens erzeugte Kapselmutante „SPN 277“  $\Delta cps$  „CUEF“ und deren wildtypischer Serotyp 7F Stamm „SPN 277“ sowie die Kapselmutanten der „Laborstämme“ Serotyp 2 „SPN D39“  $\Delta cps$ , „D39“  $\Delta cps \Delta ply$  und Serotyp 4 „SPN TIGR4“  $\Delta cps$  im Transmigrationsversuch getestet.

Die Untersuchung der Gruppe aus vier klinischen Isolaten zusammen mit den Laborstämmen „SPN 37“ und „D39“ wurde mit einem Inokulum von  $10^6$  SPN /BHS-Einsatz bei einer Inkubationszeit von 6 h durchgeführt (**Abb. 4.27**). Der Stamm „SPN 37“ transmigrierte mit  $2,6 \cdot 10^3$  CFU /mL  $+ 4,56 \cdot 10^3$  stärker als „SPN D39“ mit  $2,08 \cdot 10^1$  CFU /mL  $+ 7,22 \cdot 10^1$ . Von den vier klinischen Isolaten transmigrierte „SPN 53“ nicht über die BHS. Die stärkste Transmigration zeigte „SPN 64“ mit  $9,47 \cdot 10^3$  CFU /mL  $+ 1,24 \cdot 10^4$ . Die beiden anderen Stämme überwand die BHS-Einsätze mit einer Rate von  $4,54 \cdot 10^2$  CFU /mL  $+ 7,94 \cdot 10^2$  für „SPN 55“ und  $5,0 \cdot 10^1$  CFU /mL  $+ 1,20 \cdot 10^2$  für „SPN 57“.

Die Laborstämme zeigten bezüglich der Transmigrationsraten keine signifikanten Unterschiede untereinander, weder zwischen klinischen Stämmen und Laborstämmen, noch zwischen „gering invasiven“ und „stark invasiven“ Isolaten. Betrachtet man die Transmigrationshäufigkeit (**Abb. 4.28**), so transmigrierte „SPN 37“ mit 56 %  $+2$  signifikant häufiger als „SPN D39“ mit 8 %  $+2$  ( $p \leq 0,001$ ; t-Test). „SPN 64“ zeigte eine Häufigkeit von 73 %  $+4$ , „SPN 55“ von 42 %  $+4$  und „SPN 57“ von 42 %  $+4$ . „SPN 64“ transmigrierte signifikant

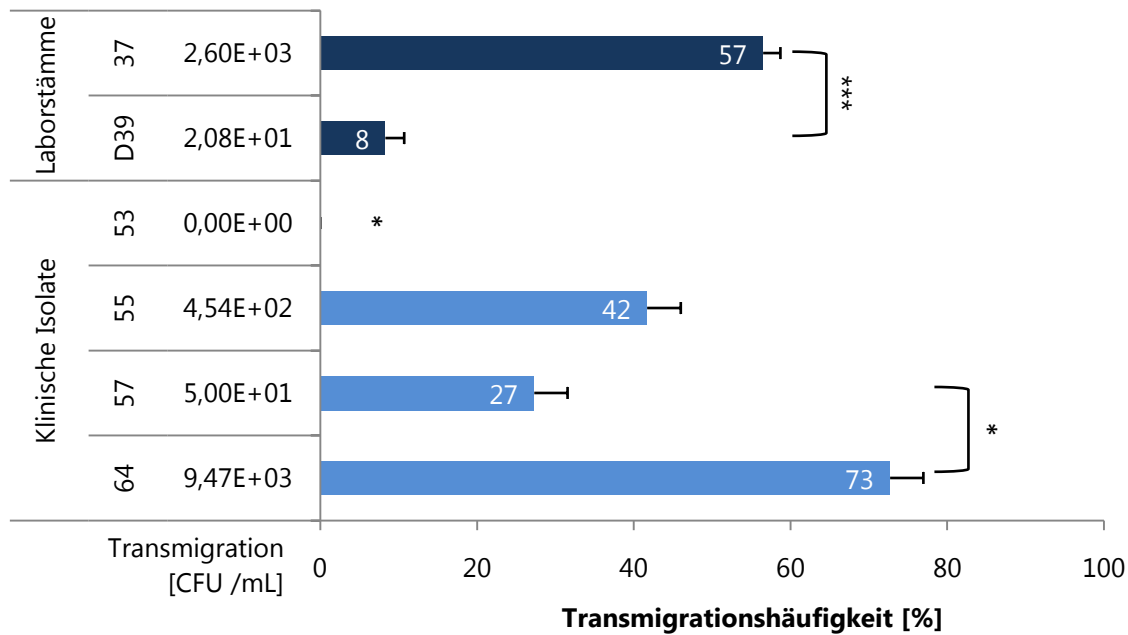
häufiger als „SPN 57“ ( $p \leq 0,05$ ; t-Test) und der Unterschied von „SPN 53“ zu den übrigen klinischen Isolaten ist auch signifikant ( $p \leq 0,05$ ; t-Test).



**Abb. 4.27:** Transmigration von „Laborstämmen“ und klinischen Pneumokokkenisolaten

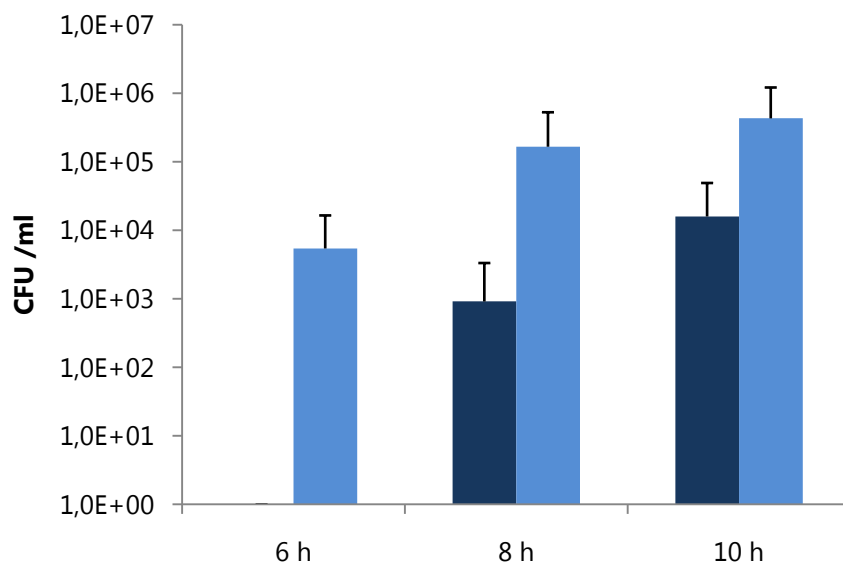
Die Transmigration von „Laborstämmen“ (**dunkelblau**) und klinischen Isolaten (**blau**) wurde mit einem Inokulum von  $10^6$  SPN pro ECV304-C6 BHS Einsatz nach 6 h Inkubation untersucht. Unterhalb der Labornummer sind die Serotypen angegeben (**St**). Die Transmigrationsraten der Laborstämme liegen im gleichen Bereich, wie die der klinischen Isolate. SPN 57 und 64 wurden als „stark invasiv“ eingestuft und weisen keine signifikant höheren Transmigrationsraten im Vergleich zu den als „gering invasiv“ eingestuften Isolaten SPN 53 und 55 auf.

Analog zu den Versuchen zur zeitabhängigen *E. coli* Transmigration, wurde die Transmigration zweier Pneumokokkenstämme nach 6, 8 und 10 h untersucht. Hierbei wurde der als „gering invasiv“ klassifizierte Stamm Serotyp 1 „SPN 53“ mit dem als „stark invasiv“ eingestuften Stamm Serotyp 6B „SPN 57“ verglichen. Das Inokulum wurde auf  $10^5$  SPN /BHS-Einsatz eingestellt. Nach 6 h Inkubation wurde eine Transmigrationsrate von  $5,44 \cdot 10^3$  CFU /mL +  $1,11 \cdot 10^4$  für „SPN 57“ festgestellt (**Abb. 4.29**). „SPN 53“ transmigrierte nach 6 h nicht und erreichte nach 8 h einen Wert von  $9,15 \cdot 10^2$  CFU /mL +  $2,42 \cdot 10^3$ . „SPN 57“ überwand die ECV304-C6 BHS nach 8 h mit  $1,66 \cdot 10^5$  CFU /mL +  $3,63 \cdot 10^5$ . Nach 10 h wurden die stärksten Transmigrationsraten festgestellt. „SPN 53“ transmigrierte mit  $1,59 \cdot 10^4$  CFU /mL +  $3,31 \cdot 10^4$  und „SPN 57“ mit  $4,30 \cdot 10^5$  CFU /mL +  $7,85 \cdot 10^5$  CFU /mL. Zwischen den Transmigrationswerten der beiden Stämme bestehen leichte Unterschiede. Der „stark invasive“ Serotyp 6B „SPN 57“ erreichte höhere Transmigrationsraten als der „gering invasive“ Serotyp 1 „SPN 53“.



**Abb. 4.28:** Transmigrationshäufigkeit von SPN-Laborstämmen und klinischen Isolaten

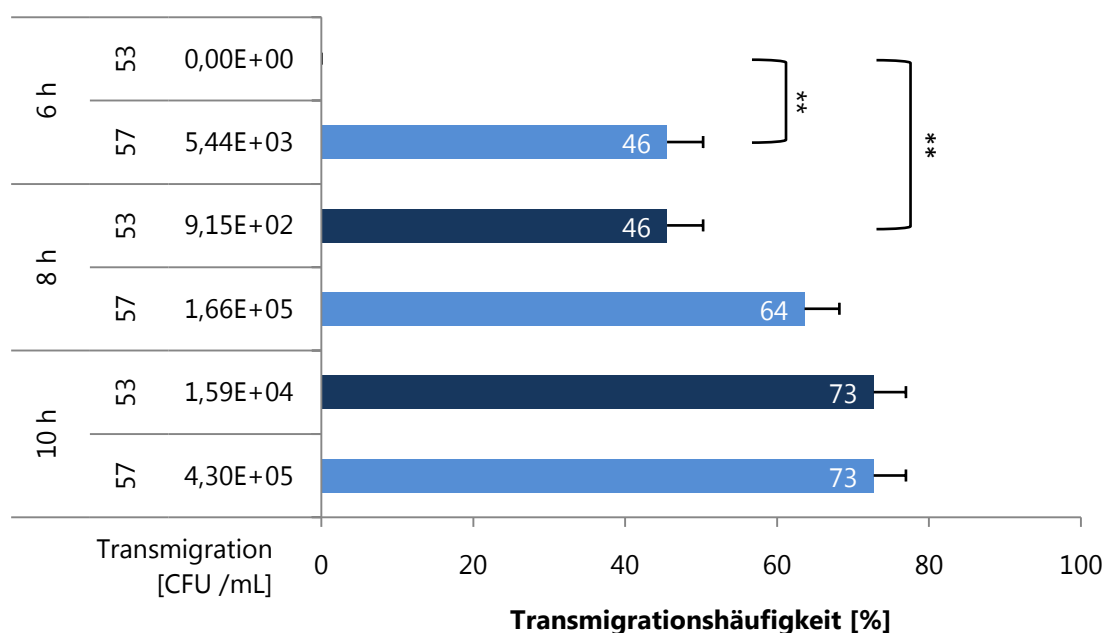
Gezeigt wird die prozentuale Transmigration der ECV304-C6 BHS-Einsätze sowie die absoluten Werte. Die Transmigration von „Laborstämmen“ (**dunkelblau**) und klinischen Isolaten (**blau**) wurde mit einem Inokulum von  $10^6$  SPN pro ECV304-C6 BHS-Einsatz nach 6 h Inkubation analysiert. Der Serotyp (St) 35A „SPN 37“ transmigrierte signifikant häufiger als der St 2 „SPN D39“. Innerhalb der Gruppe der klinischen Isolate transmigrierte St 4 „SPN 55“ keinen der BHS-Einsätze. St 23F „SPN 64“ überwand die BHS-Einsätze signifikant häufiger als St 6B „SPN 57“. St 1 „SPN 53“ und St 4 „SPN 55“ sind „gering invasive“ und St 6B „SPN 57“ und St 23F „SPN 64“ „stark invasive“ Patientenisolat. Die Sternchen zeigen die  $p$ -Werte an: \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$  (t-Test)



**Abb. 4.29:** Zeitabhängige Transmigration zweier Pneumokokkenisolate über die ECV304-C6 BHS

Die Transmigration der klinischen Isolate Serotyp 1 „SPN 53“ (**dunkelblau**) und Serotyp 6B „SPN 57“ (**blau**) wurde mit einem Inokulum von  $10^5$  SPN /BHS-Einsatz nach 6, 8 und 10 h untersucht. Nach 6 h transmigrierte nur der „stark invasive“ „SPN 57“. Der „gering invasive“ „SPN 53“ überwand erst nach 8 h die BHS. Im Verlauf der Zeit stiegen die Transmigrationsraten beider Stämme an und der „stark invasive“ Serotyp „SPN 57“ erreichte die höchsten Werte.

Signifikante Unterschiede traten bei der Betrachtung der Transmigrationshäufigkeit auf (**Abb. 4.30**). Nach 6 h Inkubation zeigte „SPN 57“ eine Transmigrationshäufigkeit von 46 % +5, was signifikant unterschiedlich zu „SPN 53“ mit 0 % ist ( $p \leq 0,01$ , t-Test) ist. Die Steigerung bei „SPN 53“ vom 6 h Wert mit 0 % auf 46 % +5 nach 8 h ist ebenfalls signifikant ( $p \leq 0,01$ , t-Test). Die Transmigrationshäufigkeiten von „SPN 57“ stiegen nach 8 h auf 64 % +5 und nach 10 h auf 73 % +4 an. Nach 10 h erreichte „SPN 53“ den gleichen Wert von 73 % +4 wie „SPN 57“. Der „stark invasive“ Serotyp 6B „SPN 57“ zeigte nach 6 und 8 h eine höhere Transmigrationshäufigkeit als der „gering invasive“ Serotyp 1 „SPN 53“. Nach 10 h hatten beide Stämme die gleiche Transmigrationshäufigkeit.

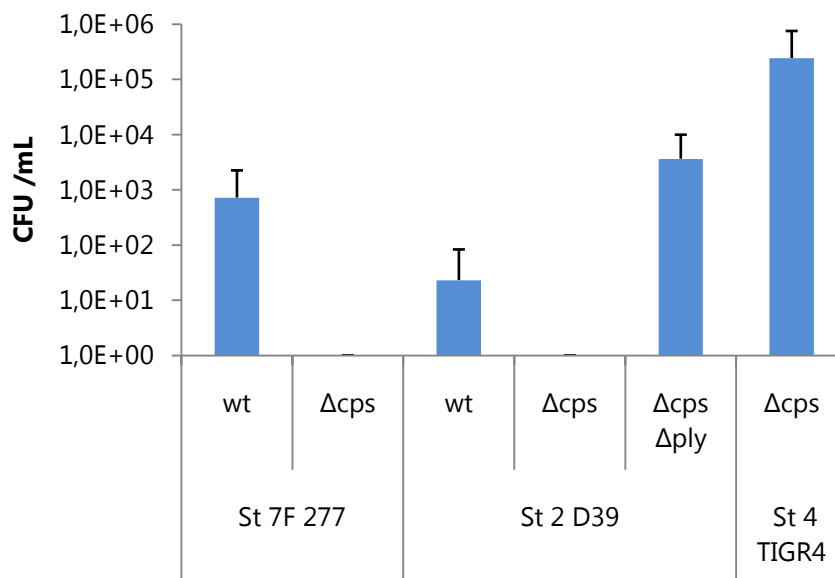


**Abb. 4.30:** Zeitabhängige Transmigrationshäufigkeit von zwei Pneumokokkenisolaten

Dargestellt ist die Häufigkeit der Transmigration über die ECV304-C6 BHS-Einsätze in Prozent. Die Werte der absoluten Transmigrationsraten sind den Balken vorangestellt. Signifikante Unterschiede treten nach 6 h zwischen Serotyp (St) 1 „SPN 53“ und St 6B „SPN 57“ sowie nach 6 und 8 h bei St 1 „SPN 53“ auf. Mit zunehmender Inkubationszeit steigen die Werte für die Transmigrationshäufigkeit an. Nach 10 h erreichen beide Stämme ähnliche Werte. Die Sternchen zeigen die  $p$ -Werte an: \*\* =  $p \leq 0,01$  (t-Test)

In einer weiteren Versuchsreihe wurden der Serotyp 7F Wildtyp „SPN 277“ und die selbst generierte Kapselmutante „SPN 277“  $\Delta cps$  „CUEF“ mit dem Serotyp 2 Wildtyp „SPN D39“ und den Kapselmutanten „D39“  $\Delta cps$  und „D39“  $\Delta cps \Delta ply$  verglichen. Eine Kapselmutante des Serotyp 4 Stammes „SPN TIGR4“ stand ebenfalls zur Verfügung. Für die Transmigrationsanalysen wurde ein Inokulum von  $10^7$  SPN /BHS-Einsatz und eine Inkubationszeit von 6 h gewählt (**Abb. 4.31**). Der Wildtyp von „SPN 277“ transmigrierte mit  $7,21 \cdot 10^2$  CFU /mL

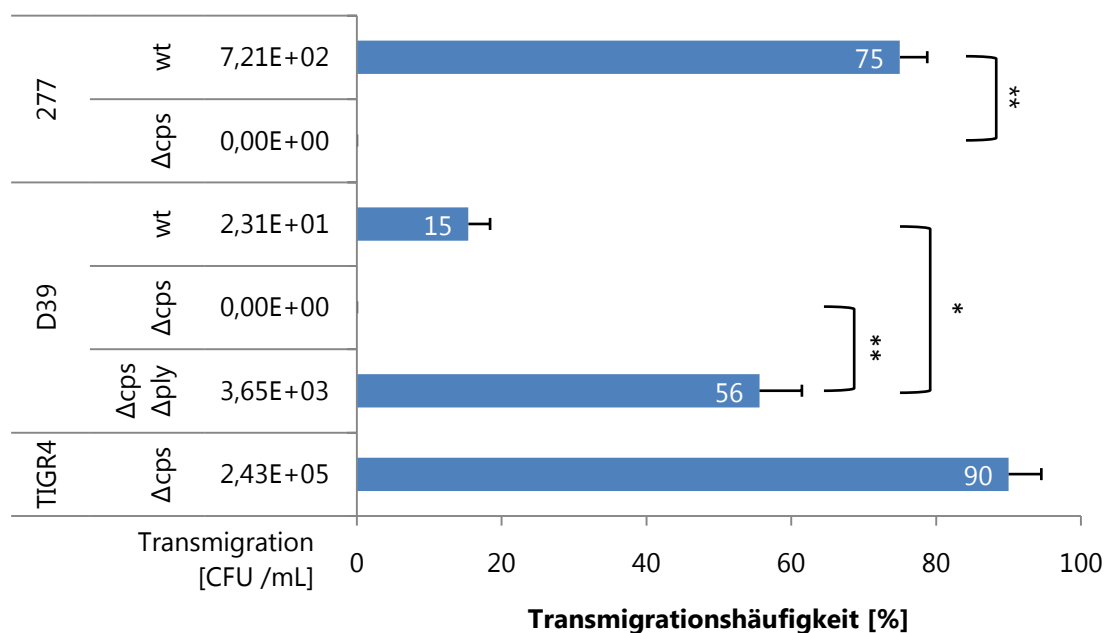
$+1,52 \cdot 10^3$  während die Kapselmutante „SPN 277“  $\Delta cps$  „CUEF“ ebenso wie die Kapselmutante von „D39“ die BHS nicht überwinden konnten. Die „D39“ Doppelmutante, die defizient für die Kapsel und das Toxin Pneumolysin ist, transmigrierte mit  $3,65 \cdot 10^3$  CFU /mL  $+6,29 \cdot 10^3$  stärker als der Wildtyp von „D39“ mit  $2,31 \cdot 10^1$  CFU /mL  $+5,99 \cdot 10^1$ . Die Kapselmutante des „TIGR4“-Stammes zeigte die stärkste Transmigration von  $2,43 \cdot 10^5$  CFU /mL  $+5,09 \cdot 10^5$ .



**Abb. 4.31:** Transmigration von Kapselmutanten über die ECV304-C6 BHS

Die Transmigration von Wildtypen (**wt**) und Kapselmutanten ( **$\Delta cps$** ) sowie einer Doppelmutante, die zusätzlich defizient für Pneumolysin ( **$\Delta ply$** ) ist, wurde mit einem Inokulum von  $10^7$  SPN pro ECV304-C6 BHS-Einsatz nach 6 h ausgewertet. Die Serotypen (**St**) sind ebenfalls angegeben. „SPN 277“ ist ein St 7F klinisches Meningitisisolat und zeigte ohne Kapsel keine Transmigration, ebenso wie die Kapselmutante von St 2 „D39“. Die Doppelmutante „D39“  $\Delta cps \Delta ply$  und die Kapselmutante von St 4 „TIGR4“ zeigen hohe Transmigrationsraten.

Beim Vergleich der Transmigrationshäufigkeit (**Abb. 4.32**) stellte sich heraus, dass der Unterschied zwischen der Kapselmutante „SPN 277“ „CUEF“ mit 0 % und dem Serotyp 7F Wildtyp „SPN 277“ mit 75 %  $+4$  signifikant höher ausfiel ( $p \leq 0,01$ ; t-Test). Der Wildtyp von Serotyp 2 „SPN D39“ transmigrierte relativ selten mit einem Wert von 15 %  $+3$ . Die Doppelmutante „D39“  $\Delta cps \Delta ply$  transmigrierte mit 56 %  $+6$  ( $p \leq 0,05$ ; t-Test) signifikant häufiger als der Wildtyp und als die Kapselmutante mit 0 % ( $p \leq 0,01$ ; t-Test). Die höchste Transmigrationshäufigkeit von 90 %  $+5$  wurde bei der Kapselmutante von Serotyp 4 „SPN TIGR4“ beobachtet.



**Abb. 4.32:** Transmigrationshäufigkeiten verschiedener Kapselmutanten über die ECV304-C6 BHS

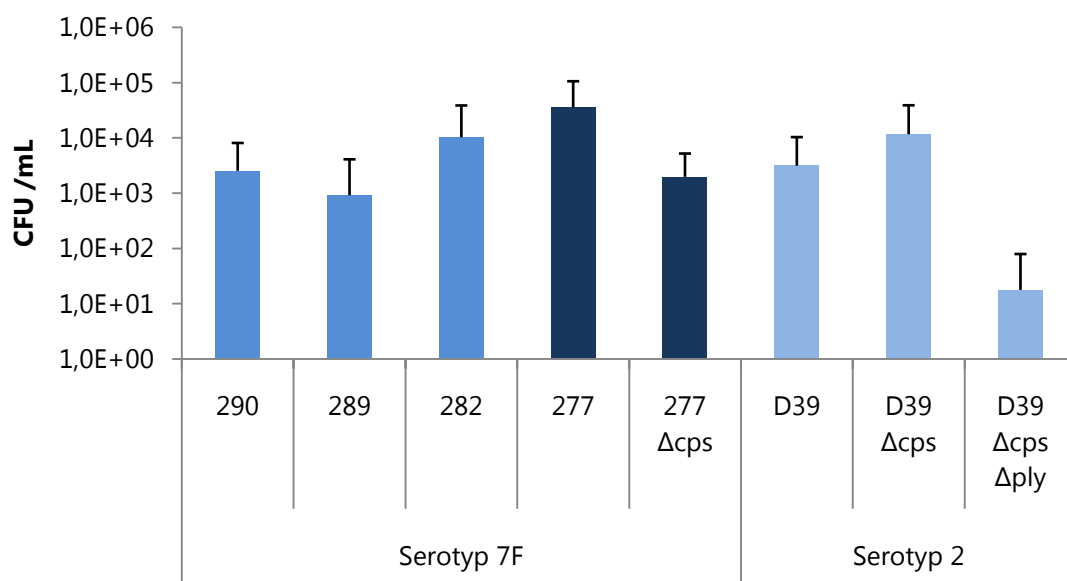
Dargestellt sind Transmigrationshäufigkeiten in Prozent von Wildtypen (**wt**), Kapselmutanten (**Δcps**) sowie einer Pneumolysin-Doppelmutante (**ΔcpsΔply**). Den Balken vorangestellt sind die absoluten Transmigrationsraten. Untersucht wurde die Transmigration nach 6 h bei einem Inokulum von  $10^7$  SPN /BHS Einsatz. Die Kapselmutanten von Serotyp (St) 7F „SPN 277“ und St 2 „SPN D39“ transmigrierten nicht. Der Unterschied zwischen St 7F „SPN 277“ und „SPN 277“ Δcps „CUEF“ ist signifikant, ebenso der Unterschied zwischen St 2 „SPN D39“ ΔcpsΔply und dem St 2 „SPN D39“ wt und dessen Kapselmutante. Die Kapselmutante von „TIGR4“ zeigte die höchste Transmigrationshäufigkeit. Die Sternchen zeigen die *p*-Werte an: \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$  (t-Test)

Die Versuche zur Transmigration verschiedener Pneumokokkenstämme und –mutanten ergaben, dass es zwischen einigen Stämmen signifikante Unterschiede bezüglich der Transmigrationshäufigkeit gibt. Allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Laborstämmen und klinischen Isolaten oder eine Korrelation von „Invasivität“ und Transmigrationsrate innerhalb der Gruppe der klinischen Isolate festgestellt werden. Die Untersuchung der Kapselmutanten zeigte keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Kapseldeletion und der Transmigration.

### 4.3.3 TRANSMIGRATION VON PNEUMOKOKKEN ÜBER DIE HBMEC-BHS

Mit dem HBMEC-Modellsystem wurde die Transmigration verschiedener Pneumokokkenstämme untersucht. Zum einen wurden die klinischen Isolate „SPN 277“, „282“, „289“ und „290“, die alle der Serogruppe 7F angehören, verwendet. Zum anderen wurde die Kapselmutante „SPN 277“  $\Delta cps$  „CUEF“ sowohl mit dem Wildtyp als auch mit dem Serotyp 2 „Laborstamm“ „SPN D39“ und dessen Kapselmutante und Kapsel-Pneumolysin-Doppelmutante verglichen.

Innerhalb der Serotyp 7F Gruppe klinischer Isolate zeigten sich ähnliche Transmigrationsraten (**Abb. 4.33**). „SPN 290“, ein CSF-Isolat eines Meningitispatienten, transmigrierte mit  $2,52 \cdot 10^3$  CFU /mL  $+5,53 \cdot 10^3$ , während „SPN 289“, ein Blutisolat eines Meningitispatienten mit  $9,13 \cdot 10^2$  CFU /mL  $+3,16 \cdot 10^3$  transmigrierte. „SPN 282“ ist als „nicht invasiv“ eingestuft und transmigrierte mit  $1,02 \cdot 10^4$  CFU /mL  $+2,82 \cdot 10^4$ . „SPN 277“ ist wiederum ein Isolat aus einem Meningitispatienten und zeigte eine Transmigration von  $3,58 \cdot 10^4$  CFU /mL  $+6,95 \cdot 10^4$ . Im Vergleich dazu transmigrierte die Kapselmutante „SPN 277“  $\Delta cps$  CUEF mit  $1,96 \cdot 10^3$  CFU /mL

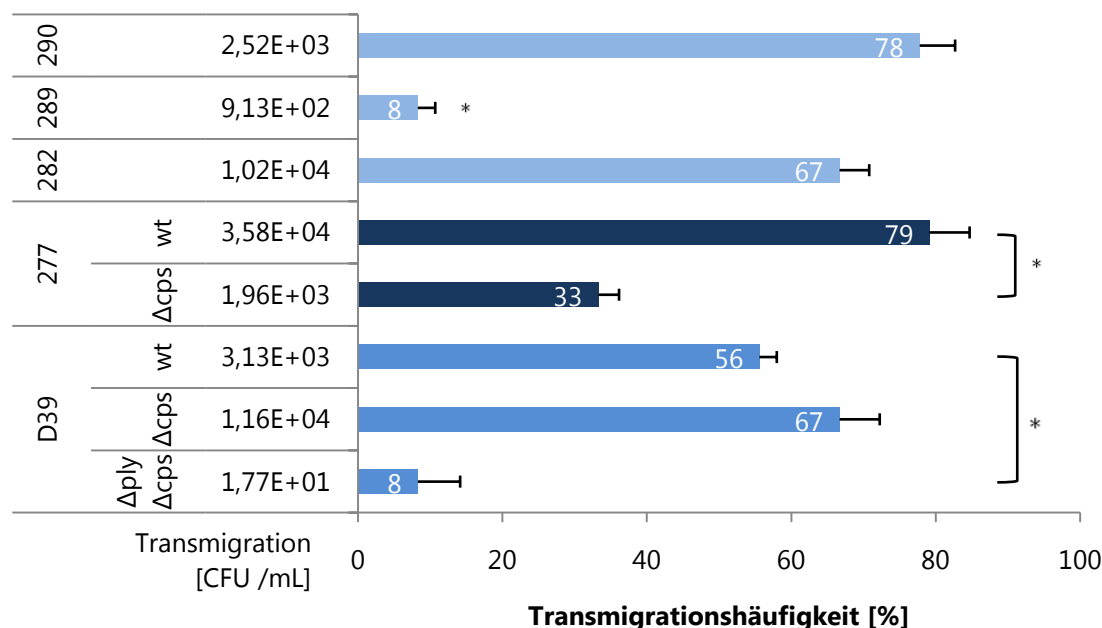


**Abb. 4.33:** Transmigration von Pneumokokkenstämmen über die HBMEC-BHS

Die Transmigration von Wildtypen (**wt**) und Kapselmutanten ( **$\Delta cps$** ) sowie einer Kapsel-Pneumolysin-Doppelmutante ( **$\Delta cps \Delta ply$** ) der Serotypen 7F und 2 wurden im HBMEC BHS-Modell untersucht. Ein Inokulum von  $10^7$  SPN /BHS Einsatz wurde appliziert. Nach 6 h Inkubation wurden die transmigrierten Pneumokokken ausplattiert. SPN „290“, „289“, „282“ und „277“ sind Serogruppe 7F klinische Isolate. „SPN 290“, „289“ und „277“ wurden aus Meningitispatienten isoliert. „SPN 282“ ist ein Trägerisolat. Die Transmigrationsraten innerhalb der 7F Gruppe zeigten keine großen Unterschiede. Die selbst erzeugte Kapselmutante „277“  $\Delta cps$  „CUEF“ hatte im Vergleich zum Wildtyp keine signifikant abweichende Transmigrationsrate. Die Kapselmutante des Serotyp 2 „Laborstammes“ „D39“ transmigrierte minimal stärker als der wildtypische „D39“. Die Doppelmutante zeigte die geringste Transmigration.



+3,22\*10<sup>3</sup> ( $p < 0,09$ ; t-Test). Die vergleichende Untersuchung mit dem „Laborstamm“ „D39“ und dessen Kapselmutante und Kapsel-Pneumolysin-Doppelmutante ergab keine signifikanten Unterschiede. „SPN D39“ transmigrierte mit 3,13\*10<sup>3</sup> CFU /mL +7,15\*10<sup>3</sup>. Die Mutante „D39“  $\Delta cps$  überwand die HBMEC-BHS mit 1,16\*10<sup>4</sup> CFU /mL +2,71\*10<sup>4</sup> und die Doppelmutante mit 1,77\*10<sup>1</sup> CFU /mL +6,12\*10<sup>1</sup>.



**Abb. 4.34:** Transmigrationshäufigkeit von Pneumokokkenstämmen über die HBMEC-BHS

Dargestellt ist Transmigrationshäufigkeit in Prozent von Wildtypen (**wt**) und Kapselmutanten ( **$\Delta cps$** ) sowie einer Kapsel-Pneumolysin-Doppelmutante ( **$\Delta cps \Delta ply$** ) der Serotypen 7F und 2 im HBMEC BHS-Modell. Den Balken vorangestellt sind die absoluten Transmigrationsraten. Die Serotyp 7F klinischen Isolate „277“, „282“ und „290“ transmigrierten ca. 10fach häufiger als das Serotyp 7F klinische Isolat „289“. Die Kapselmutante des Stammes „277“ transmigrierte ca. 2,5fach weniger als der Wildtyp. Die Kapselmutante des Serotyp 2 „Laborstammes“ „D39“ transmigrierte leicht häufiger als der Wildtyp, hingegen überwand die Doppelmutante die BHS wesentlich weniger häufig. Die Sternchen zeigen die  $p$ -Werte an: \* =  $p \leq 0,05$  (t-Test)

Betrachtet man die prozentuale Anzahl der transmigrierten BHS-Einsätze (**Abb. 4.34**), so ergaben sich für die Serogruppe 7F klinischen Isolate „SPN 277“ 79 % +6, für „SPN 282“ 67 % +4, für „SPN 289“ 8 % +2 und für „SPN 290“ 78 % +5. Damit ist die Transmigrationshäufigkeit von „SPN 289“ signifikant geringer als die der übrigen Serotyp 7F Isolate ( $p \leq 0,05$ ; t-Test). Im Vergleich von „SPN 277“ und dessen Kapselmutante sank der Wert von 79 % +6 signifikant auf 33 % +3 für die Kapselmutante ab ( $p \leq 0,05$ ; t-Test). Der Laborstamm „D39“ hatte eine prozentuale Transmigrationsrate von 56 % +2. Bei der Mutante „D39“  $\Delta cps$  stieg die prozentuale Transmigration leicht auf 67 % +6 an, während die Doppelmutante „D39“

*ΔcpsΔply* eine Transmigrationsrate von 8 % +6 zeigte. Diese ist signifikant geringer als die Transmigrationshäufigkeit des Wildtyps ( $p \leq 0,05$ ; t-Test).

Die Untersuchung der Transmigration klinischer Pneumokokkenisolate der Serogruppe 7F über die HBMEC BHS ergab, dass alle Isolate unabhängig von ihrer klinischen Charakterisierung ähnliche Transmigrationsraten aufwiesen. Im Vergleich zu Serotyp 2 „SPN 39“ Stämmen und Mutanten zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede. Die Auswertung der Transmigrationshäufigkeit ergibt ein heterogenes Bild. Der Serotyp 7F „SPN 282“ ist ein Trägerisolat und zeigte eine ähnliche Transmigrationshäufigkeit wie Isolate aus Meningitispatienten, während das Meningitisisolat „SPN 289“ eine signifikant geringere Transmigrationshäufigkeit gegenüber anderen Meningitisisolaten aufwies. Hinsichtlich der Kapselmutanten zeigte die Serotyp 7F „SPN 277“ Kapselmutante eine signifikante Verringerung der Transmigrationshäufigkeit gegenüber dem Wildtyp. Die Kapseldeletion bei Serotyp 2 „SPN D39“ blieb jedoch ohne signifikanten Effekt. Erst die Kapsel-Pneumolysin-Doppelmutante führte zu einer signifikanten Verringerung der Transmigrationshäufigkeit.

## 5 DISKUSSION

Trypanosomen sind die Erreger der afrikanischen Schlafkrankheit und verursachen eine tödliche ZNS-Infektion. Unter den Streptokokken gibt es einige Arten die beim Menschen die BHS überwinden und eine lebensbedrohliche Meningitis auslösen können. In dieser Arbeit wurden BHS-Modellsysteme wie das ECV304-C6 Modell und das HBMEC-Modell optimiert und für die Analyse der Transmigration von Trypanosomen und Streptokokken eingesetzt. Die Etablierung und Optimierung von BHS-Modellen erforderte eine sorgfältige Charakterisierung der Kulturbedingungen und Modelleigenschaften. Das ECV304-C6 BHS-Modellsystem wurde für die vergleichende Untersuchung von human- und tierpathogenen Trypanosomen verwendet. Die Optimierung der Kulturbedingungen legte die Grundlage für reproduzierbare Ergebnisse in den Transmigrationsversuchen mit Trypanosomen. Die Überwindung der BHS von Streptokokken wurde in beiden Modellsystemen untersucht und besonderes Augenmerk wurde auf die Rolle der Kapsel im Transmigrationsprozess gelegt. Für diese Untersuchungen wurden neben zahlreichen Stämmen von Gruppe B und C Streptokokken auch Pneumokokken und deren Kapselmutanten verwendet. In einem Fall konnte eine kapseldefiziente Mutante eines Serotyp 7F klinischen Isolates erzeugt und bezüglich ihres Transmigrationsverhaltens charakterisiert werden.

### 5.1 BHS-MODELLE

Die Verwendung von *in vitro* BHS-Modellen ist der Versuch, eine komplexe *in vivo* Situation auf eine einfache und praktische Anwendung, die immer noch essentielle *in vivo* Merkmale beinhaltet, zu reduzieren. Die essentiellen Merkmale sind die wissenschaftlich anerkannten allgemeinen Eigenschaften der BHS sowie die für die spezifische Anwendung erforderlichen Eigenschaften. Zu den allgemeinen Eigenschaften einer BHS gehört die Expression von „tight junctions“ (TJ) Proteinen und deren BHS-spezifische Organisation (Wolburg & Lippoldt, 2002). Durch die TJ und ihre Anordnung werden die Endothelzellen derart dicht mit einander verbunden, dass der parazelluläre Stoffaustausch, sogar der von Ionen, unterbunden wird (Butt *et al.*, 1990). Diese Eigenschaft lässt sich durch die Messung der parazellulären Diffusion von nachweisbaren Markern wie Evans Blue Albumin oder FITC-Dextran oder durch die Messung des transendothelialen Widerstandes (TEER) bestimmen (Deli *et al.*, 2005). Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung eines nicht invasiven Kontrollstammes wie

beispielsweise *E. coli* HB101 (Stins *et al.*, 2001). Diese Methode ist besonders für Infektionsmodelle interessant.

Das in dieser Arbeit verwendete ECV304-C6 BHS-Modell ist eine Optimierung der 1996 nach Hurst und Fritz beschriebenen Kombination der humanen endothelartigen Zelllinie ECV304 und der Gliazelllinie C6 aus der Ratte. Hurst und Fritz konnten zeigen, dass durch die Kokultur der beiden Zelllinien sowohl die Diffusion von  $^3\text{H}$ -Sucrose eingeschränkt als auch die TEER-Werte erhöht waren (Hurst & Fritz, 1996; Hurst, 2000). Während nicht zerebrales Endothel TEER-Werte von  $2\text{--}20\ \Omega/\text{cm}^2$  aufweist (Butt *et al.*, 1990), erreichte die ECV304-C6 Kombination von Hurst und Fritz  $200\ \Omega/\text{cm}^2$  (Hurst & Fritz, 1996). Den Nachweis für das Vorhandensein komplexer TJ erbrachten Hurst und Fritz mittels Gefrierbruch-elektronenmikroskopie (Hurst & Fritz, 1996).

Auf diesen Vorarbeiten aufbauend konnte das ECV304-C6 Modell für Infektionsstudien optimiert werden. Grundvoraussetzung für ein Transmigrationsmodell der BHS ist eine konfluente Endothelzellschicht. Da die Endothelzellschicht in den Matrigeltranswelleinsätzen im Lichtmikroskop nur schlecht evaluiert werden kann, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen nach fünftägiger Kultur angefertigt. Die Bilder zeigten eine konfluente ECV304-Zellschicht ohne größere Lücken oder Spalten. Kleinere Risse sind wahrscheinlich das Ergebnis der Fixierung, Entwässerung und der anschließenden „kritische Punkt“-Trocknung. Durch die hoch auflösende, starke Vergrößerung des Elektronenmikroskops wurde sichtbar, dass die ECV304-Zellen „puzzleteilartig“ miteinander verbunden sind und dass sich die Zellen an den Zellgrenzen auch überlappen. Durch die REM-Aufnahmen konnte die Struktur der Zellschichten aufgeklärt werden. Die Evaluierung der funktionalen parazellulären Dichtigkeit erfolgte mit Hilfe des *E. coli* HB101 Stammes. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass in 80 % der BHS-Transwelleinsätze keine *E. coli* HB101 Transmigration stattfand (Untucht, 2007). Als Voraussetzung für die Überwindung der BHS gelten im Fall von *E. coli* die Adhäsion an und die Invasion in zerebrale Endothelzellen (Kim, 2003). *E. coli* HB101 exprimiert keine S-Fimbrien, welche die Adhäsion an Glykoproteine und -lipide von BMECs (brain microvascular endothelial cells) ermöglichen. Dementsprechend ist die Fähigkeit von *E. coli* HB101 zur Zelladhärenz stark reduziert (Huang *et al.*, 1995; Stins *et al.*, 1994). Weiterhin besitzt dieser Stamm nicht die für eine invasive Ausbreitung notwendigen Proteine (Huang *et al.*, 1995; Kim, 2000; Stins *et al.*, 1999). Da die Gene für diese Proteine fehlen beispielsweise einige *ibe*-Gene (zusammenfassend dargestellt in (Nikolskaia *et al.*, 2008)) kann der HB101-Stamm

Gewebebarriere nur noch parazellulär durch Lücken in der Endothelschicht überwinden und seine Transmigration ist somit ein Maß für die parazelluläre Permeabilität. Daher wird *E. coli* HB101 als Negativkontrolle in Infektionsstudien eingesetzt, z. B. bei der Etablierung des HBMEC-Modellsystems (Stins *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurden Bedingungen etabliert, die zu einer 100 %igen Impermeabilität des ECV304-C6 BHS-Modells für *E. coli* HB101 führten. Die hierfür maßgebliche Veränderung war der Austausch des FCS-supplementierten M199-Mediums durch das serumfreie Quantum 286 (Q286) Medium. Letzteres ist von der Firma PAA Laboratories GmbH für Epithelzellen konzipiert worden. Epithelzellen bilden im Körper wichtige Barrieren und diese Eigenschaft kann *in vitro* durch bestimmte Faktoren, die in FCS oder anderen Seren enthalten sind, beeinflusst werden. Um diese Einflüsse zu verhindern, enthält das Medium anstatt Seren „Proteinfraktionen aus Hefe und Sojabohne“, die genaue Rezeptur bleibt jedoch Firmengeheimnis (PAA, 2011). Der Einfluss von FCS auf Barrieremodelle ist variabel (Deli *et al.*, 2005). Daher ist es gängige Praxis verschiedene Serumchargen von verschiedenen Händlern auszutesten, um optimale Kulturbedingungen zu erhalten. Bereits die Veränderung des Serumanteils wirkt sich auf die Permeabilität der Zellschicht aus. Im ECV304-C6 Modell wurde nach einer Serumreduktion von 10 auf 2 oder 0 % eine Abnahme des TEERS um fast die Hälfte festgestellt. Auch Transmigrationshäufigkeit von *E. coli* HB101 stieg nach Serumreduktion auf 1 % um ca. 50 % an (Untucht, 2007). Die Verwendung unterschiedlicher Kulturbedingungen könnte ein Grund dafür sein, dass die TEER-Werte in der Literatur über die ECV304-C6 Kombination zwischen einzelnen Arbeitsgruppen variieren. Die veröffentlichten TEER-Werte liegen zwischen 80 und 200  $\Omega$  /cm<sup>2</sup> (Easton & Abbott, 2002; Hurst & Fritz, 1996; Scism *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 2001). Um für gleichbleibende Kulturbedingungen bezüglich des FCS zu sorgen, wurden nach der erfolgten Optimierung des ECV304-C6 BHS-Modells sämtliche Zellkulturmedien außer Q286 unter Zusatz einer bestimmten FCS Charge (Lot: 0991L, S0115 von Biochrom AG) verwendet.

In dieser Arbeit wurde neben dem ECV304-C6 Modell auch das HBMEC BHS-Modell erfolgreich etabliert. Möglicherweise war die Verwendung der speziellen FCS-Charge ein Grund für die erfolgreiche Etablierung mit einer 100 %igen Dichtigkeit bezüglich der Transmigration von *E. coli* HB101. In vorangegangenen Arbeiten konnte nur eine 25 %ige Impermeabilität erreicht werden (Untucht, 2007). In der Erstveröffentlichung über das BHS-Modell mit der HBMEC-Zelllinie von Stins und Kollegen zeigt *E. coli* HB101 noch minimale Transmigrationsraten (unter 1 % des Inokulums von  $5 \cdot 10^6$  CFU /mL) nach 2 h Inkubation (Stins

*et al.*, 2001). Die Autoren geben allerdings keine Auskunft über das Verhältnis von transmigrierten zu nicht transmigrierten BHS-Einsätzen. Daher wird nicht ersichtlich, ob *E. coli* HB101 in einigen HBMEC-Transwelleinsätzen stark transmigrierte und andere gar nicht, oder ob alle getesteten HBMEC-Transwelleinsätze mit einer ähnlich niedrigen Rate transmigriert wurden.

Der Unterschied zwischen den Werten der Erstveröffentlichung und den Werten aus den eigenen Arbeiten könnte auch darin begründet liegen, dass Stins und Kollegen ein Inokulum von  $5 \cdot 10^6$  *E. coli* pro BHS-Einsatz im Gegensatz zu  $1 \cdot 10^5$  *E. coli* pro BHS-Einsatz in den eigenen Studien verwendeten. Stins und Kollegen untersuchten die Transmigration nach 2 und 8 h während die Inkubationszeit in dieser Arbeit 6 h betrug. Im optimierten ECV304-C6 BHS-Modell konnte gezeigt werden, dass bei einer Erhöhung des Inokulums auf  $10^7$  *E. coli* HB101 pro BHS-Einsatz immer noch keine Transmigration stattfand. Für einen direkten Vergleich zwischen dem publizierten und dem in dieser Arbeit verwendeten HBMEC-Modell wären weitere Versuche mit möglichst vielen übereinstimmenden Versuchsparametern notwendig. Für den Vergleich der beiden eigenen BHS-Modelle wären Inokuli- und zeitabhängige Transmigrationsversuche mit dem HBMEC BHS-Modell interessant.

Da die in dieser Arbeit verwendeten BHS-Modelle eine 100 %ige Impermeabilität für die *E. coli* HB101 aufwiesen, wäre es interessant, welche TEER-Werte sich mit diesem Modellsystem erreichen lassen. Für die TEER-Messungen stehen prinzipiell mehrere Methoden zur Verfügung. Die in einigen Laboren verwendeten Chopstick-Elektroden sind in der Handhabung variabel bezüglich des relativen Abstands der beiden Elektroden zueinander, dem Eintauchwinkel, der Eintauchtiefe und der relativen Position zur Endothelzellschicht (Reichel *et al.*, 2003). Daher stellt sich bei dieser Methode die Frage nach der Vergleichbarkeit zwischen Ergebnissen verschiedener Labore. Für das HBMEC-Modell wurden beispielsweise Werte von 200-250  $\Omega / \text{cm}^2$  (Chen *et al.*, 2003) oder 300-400  $\Omega / \text{cm}^2$  (Stins *et al.*, 2001) gemessen. Ein anderes, kostenintensives Messgerät ist das CellZscope von NanoAnalytics GmbH, welches festsitzende Elektroden besitzt und 24 Messungen parallel bei gleichzeitiger Inkubation im Brutschrank ermöglicht. In der Theorie wäre es möglich, jeden BHS-Einsatz vor der Transmigrationsuntersuchung auf seine Dichtigkeit zu testen und die Veränderungen der TEER-Werte im Verlauf der Transmigration zu bestimmen (sog. realtime-TEER-Messungen).

Entsprechend der Erstveröffentlichung zeigt die HBMEC-BHS mit TEER-Werten zwischen 300 und 400  $\Omega/\text{cm}^2$  prinzipiell eine noch größere Dichtigkeit als das ECV304-C6 Modell nach Hurst und Fritz, aber ob sich aus den Widerstandswerten eines BHS-Modells die Impermeabilität für einen *E. coli* Stamm ableiten lässt, ist fraglich. Eine in diesem Zusammenhang interessante Fragestellung wäre, ob es tatsächlich eine direkte Abhängigkeit zwischen der Ausbildung eines elektrischen Widerstandes über einer Endothelzellschicht und ihrer Dichtigkeit im Hinblick auf die Transmigration von verschiedenen Pathogenen gibt. Sollte es einen Schwellenwert beim elektrischen Widerstand geben, so wäre bei Transmigrationsstudien nur noch dieser Schwellenwert interessant und nicht mehr die maximale Widerstandshöhe eines BHS-Modells.

Die Verwendung von *E. coli* HB101 bei der Evaluierung von BHS-Modellen für Infektionsversuche hat den Vorteil, dass dieser avirulente Stamm mit dem hoch virulenten und invasiven *E. coli* K1 als einen Erreger neonataler Meningitiden (Kim, 2003) verglichen werden kann. Die Untersuchung der *E. coli* K1 Transmigration über das optimierte ECV304-C6 BHS-Modell zeigte, dass der verwendete *E. coli* K1 Stamm wesentlich stärker in Abhängigkeit der Inkubationszeit und des Inokulums über die BHS-Einsätze transmigrierte als der HB101 Stamm. *E. coli* HB101 überwand die ECV304-C6 BHS entweder gar nicht oder erst mit einer geringen Transmigrationsrate bei einer hohen Inkubationszeit. Dieser starke Unterschied zwischen der *E. coli* K1 und HB101 Transmigration wurde auch im publizierten HBMEC-Modell beobachtet (Stins *et al.*, 2001). Stins und Kollegen konnten weiterhin zeigen, dass die TEER-Werte nach der *E. coli* K1 Transmigration nicht signifikant absanken, was auf eine transzelluläre Transmigration ohne die Zerstörung der parazellulären Integrität hindeutet. *E. coli* K1 scheint einen ZNS-Tropismus zu besitzen, da er mit zerebralen Endothelzellen wie HBMECs interagiert, jedoch nicht mit anderen Endothelzellen wie beispielsweise „human umbilical vein endothelial cells“ (HUVEC) (Huang *et al.*, 1995; Nikolskaia *et al.*, 2008; Stins *et al.*, 1994). Somit ist ein starker Unterschied in der BHS-Transmigration zwischen *E. coli* K1 und HB101 eines der eingangs erwähnten anwendungsspezifischen Charakteristika und in diesem Fall das Merkmal eines selektiv permeablen Infektionsmodells.

Ein wichtiger Aspekt bei der Verwendung von *E. coli* Stämmen zur Charakterisierung von BHS-Modellen ist die Tatsache, dass es sich um vermehrungsfähige gram-negative Bakterien handelt. Beide dieser Eigenschaften können sich auf die BHS-Permeabilität auswirken. Die Transmigrationsversuche laufen in Zellkulturmedien ab. Diese Medien sind komplexe

Vollmedien und damit ein gutes Nährmedium für *E. coli*. Des Weiteren sind in einem 24-well Transwellsystem die Volumina der unteren und oberen Kammer relativ klein und enthalten bereits viele BHS-Zellen. Gibt man nun ein hohes Inokulum vermehrungsfähiger Bakterien hinzu, werden die Nährstoffe rasch verbraucht und die pH-Pufferkapazität schnell erschöpft. Die Kulturbedingungen verschlechtern sich und das Medium säuert sich an, was durch die Farbänderung des Indikators Phenolrot im Medium angezeigt wird. Bei einer derartigen Verschlechterung der Kulturbedingungen kann eine transmigrationsunspezifische Beeinträchtigung der BHS-Integrität nicht ausgeschlossen werden. Der zweite erwähnte Faktor ist das Lipopolysaccharid (LPS) in der Zellwand von *E. coli*, welches sich ab einer bestimmten Konzentration negativ auf die Dichtigkeit von Endothelschichten auswirkt (Gaillard *et al.*, 2003; Meyrick *et al.*, 1986; Nooteboom *et al.*, 2000). Daraus resultiert, dass ein BHS-Modellsystem nur dann verlässliche Aussagen erlaubt, wenn die zu untersuchenden Mikroorganismen und potentiellen ZNS-Pathogene bezüglich ihrer Inokuli und Inkubationszeit an die Kapazität des Modellsystems angepasst werden. Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit die Gruppe B und C Streptokokken mit Inokuli von  $10^4$  und  $10^5$  Bakterien pro BHS-Einsatz und Pneumokokken mit Inokuli von  $10^5$ ,  $10^6$  und  $10^7$  Bakterien pro BHS-Einsatz verwendet.

Ein wichtiger Unterschied zwischen den publizierten Modellen anderer Arbeitsgruppen und den in dieser Arbeit verwendeten, ist die Verwendung von Matrigel. Matrigel ist eine *ex vivo* extrazelluläre Matrix (ECM), die aus dem aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maussarkomen isoliert wird. Matrigel ist eine komplexe Mischung, die laut Herstellerangaben aus den Hauptkomponenten Laminin (56 %), Kollagen IV (31 %), Entactin (8 %) und Heparansulfat Proteoglykanen als gelierende Matrix besteht. Im Vergleich zu unbeschichteten Transwelleinsätzen oder Transwelleinsätzen, die spezifisch mit einer Komponente wie Kollagen I beschichtet sind, entspricht Matrigel mehr der Komplexität einer *in vivo* ECM. Bei der Verwendung von Matrigel ist der tumoröse Ursprung zu beachten, denn es sind Wachstumsfaktoren enthalten, die „natürlicher Weise“ in diesem Tumor vorkommen (Becton&Dickinson, 2011). Die eigenen Arbeiten haben gezeigt, dass Matrigel für ein dichtes BHS-Modell essentiell ist, sowohl im Fall der ECV304-C6 BHS (Untucht, 2007; Untucht *et al.*, 2011) als auch bei der HBMEC-BHS. Bei letzterem wurde alternativ zu Matrigel eine Gelatinebeschichtung der Transwelleinsätze vorgenommen (Lüttge *et al.*, noch unveröffentlicht). Die Modellvariante mit Gelatine zeigte aber im Vergleich mit der Variante



ohne Gelatinebeschichtung ähnliche Transmigrationsraten von *E. coli* HB101. Demzufolge hat die Gelatinebeschichtung keine Auswirkung auf die Permeabilität. Dies deutet darauf hin, dass entweder die Gelatinebeschichtung optimiert werden kann, oder dass diese Art der Beschichtung für HBMEC-Zellen nicht geeignet ist. Wichtige Faktoren für die Optimierung der Gelatinebeschichtung wären die Variation der Konzentration und der Schichtdicke.

Wie einleitend bereits erwähnt, ist die Zusammensetzung der ECM zwischen Endothelzellen und Astrozyten von großer Bedeutung und wird von den Endothelzellen und Astrozyten aktiv gestaltet, z.B. durch die Sekretion von Agrin (Smith & Hilgenberg, 2002; Wolburg *et al.*, 2009). Agrin bindet Laminin und Dystroglykan, das in der Zellmembran verankert ist und sorgt möglicherweise auf diese Art für eine engere Vernetzung von ECM und Zellen (Smith & Hilgenberg, 2002). Matrigel enthält größtenteils Laminin und bietet somit die Möglichkeit über sezerniertes Agrin die Quervernetzung zu fördern. Weiterhin haben die Lamininisformen Einfluss auf die Transmigration beispielsweise auf die von Leukozyten oder Trypanosomen (Masocha *et al.*, 2004; Sixt *et al.*, 2001). Über die Isoformen von Laminin im Matrigel ist jedoch nichts bekannt. In beiden BHS-Modellen in dieser Arbeit hatte Matrigel einen positiven Einfluss auf die Dichtigkeit. Daher wäre es interessant, den Einfluss der verwendeten Zellen auf das Matrigel zu untersuchen. Möglicherweise werden neue Komponenten wie das erwähnte Agrin hinzugefügt oder vorhandene Komponenten modifiziert. Eine Möglichkeit, neue Komponenten zu entdecken, wäre die Analyse mittels Massenspektrometrie.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen dem ECV304-C6 BHS-Modell und dem HBMEC BHS-Modell ist die Verwendung von Astrozyten. Während HBMEC-Zellen in Monokultur konfluente Zellschichten mit hoher Dichtigkeit ausbilden (Stins *et al.*, 2001), führen Induktionsprozesse von Astrozyten im ECV304-C6 BHS-Modell zu einer Verringerung der Permeabilität (Hurst & Fritz, 1996; Kuchler-Bopp *et al.*, 1999). Die BHS ist *in vivo* eine dynamische Barriere und diese Dynamik wird durch kontinuierliche Induktionsprozesse aufrecht erhalten (Abbott, 2005; Wolburg *et al.*, 2009). Die Kombination von Astrozyten und Endothelzellen in einem BHS-Modell ermöglicht prinzipiell auch die Interaktion der Zellen untereinander während eines Infektionsereignisses. Eine der Stärken des ECV304-C6 Modells ist möglicherweise, dass bis zu einem gewissen Grad die *in vivo* Dynamik *in vitro* widergespiegelt wird. Durch Transkriptom- und Proteomuntersuchungen könnten

möglicherweise die molekularen Akteure dynamischer Prozesse während einer Infektion aufgedeckt werden.

Von den induktiven Signalen der Astrozyten ist lediglich bekannt, dass es sich um lösliche Faktoren handelt (Dehouck *et al.*, 1990; Janzer & Raff, 1987). Daher induzierten Kulturüberstände von C6-Astrozyten ebenfalls BHS-Eigenschaften in ECV304-Zellen (Hurst & Fritz, 1996). Lösliche Signalmoleküle erlauben es, die C6-Zellen durch eine Membran getrennt mit den ECV304 zu kultivieren ohne dass die induktiven Eigenschaften verloren gehen. Um dennoch eine räumliche Nähe einzuhalten und somit der *in vivo* Situation näher zu kommen, wurden die Astrozyten auf der Unterseite der Membran aufgebracht und kultiviert. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen haben gezeigt, dass die C6-Astrozyten hängend kultiviert werden können und nicht den Kontakt zur Membran verlieren. Vielmehr bilden sie einen lockeren Zellverband mit Lücken und Spalten, die teilweise wesentlich größer sind als die Poren der Membran und daher vermutlich kein Hindernis für die Transmigration von Bakterien oder Trypanosomen darstellen. Der induktive Effekt kann durch die Kokultur mit primären Ratten-Astrozyten noch verstärkt werden. Dies wurde für „bovine brain capillary endothelial cells“ (BBCEC) (Boveri *et al.*, 2005) und für ECV304-Zellen gezeigt (Tan *et al.*, 2001). Die Verwendung primärer Zellen wurde aus den bei der Gewinnung und Kultur solcher Zellen auftretenden Problematiken vermieden. Hierzu gehören die Sicherstellung der Qualität und Homogenität des Ausgangsmaterials und die Frage nach Reinheit der isolierten Zellen.

Tan und Kollegen untersuchten den Einfluss von C6-Astrozyten auf verschiedene kommerziell erhältliche Endothelzelllinien und stellten fest, dass zwar in der Kokultur mit C6-Zellen die Dichtigkeit der getesteten Zelllinien erhöht wurde, die gemessenen TEER-Werte lagen allerdings alle unter  $20 \Omega / \text{cm}^2$  und damit wesentlich unterhalb der Werte des ECV304-C6 Modells (Tan *et al.*, 2001). Im Rahmen der Evaluierung eines dichten HBMEC BHS-Modells wurde auch untersucht, ob die HBMECs für induktive Signale der C6-Astrozyten empfänglich sind. HBMEC-Zellen, die drei Tage in unbeschichteten Transwelleinsätzen mit C6-Zellen kultiviert wurden, zeigen eine deutliche Reduktion der Permeabilität für *E. coli* HB101. Wurden HBMEC- und C6-Zellen unter Verwendung von Matrigeltranswelleinsätzen für fünf Tage kultiviert, war *E. coli* HB101 nicht in der Lage die Barriere zu überwinden. Unter gleichen Bedingungen aber ohne Matrigel wurde eine hohe Transmigrationsrate festgestellt. Ein dichtes HBMEC BHS-Modell ohne C6-Zellen konnte durch die Erhöhung des HBMEC-Inokulums in Matrigeltranswelleinsätzen erzielt werden. Durch das Aussähen von einer

größeren Zellzahl wurde eine dichte Zellschicht „erzwungen“ und bedurfte nicht der induktiven Astrozytensignale. Möglicherweise würden rasterlektronenmikroskopische Aufnahmen Unterschiede in der Struktur der HBMEC-Zellschicht zwischen beiden HBMEC BHS-Varianten aufzeigen. Immunofluoreszenzmikroskopie von markierten TJ-Proteinen wäre eventuell auch geeignet, um die Expression beispielsweise von Claudinen in beiden Modellsystemen miteinander zu vergleichen. Das HBMEC-Zellen für induktive Signale von Astrozyten empfänglich sind, steht wahrscheinlich mit ihrem zerebralen Ursprung in Verbindung. Für die Untersuchung der Transmigration von Pneumokokken wurde nicht das HBMEC-C6 Modell sondern das HBMEC-Modell verwendet, um eine bessere Vergleichbarkeit zum ursprünglichen HBMEC-Modell zu ermöglichen.

Die in dieser Arbeit verwendeten BHS-Zellen sind immortalisierte Zelllinien. Neben den bereits erwähnten Nachteilen von primären Zellen sind noch die instabile Markerexpression und die Kulturdauer zu erwähnen. Von primären Zellen ist allgemein bekannt, dass sie nach einer bestimmten Anzahl an Passagierungen das Wachstum einstellen. Von noch größerer Bedeutung ist die Veränderung des Markerprofils. Nach einer bestimmten Anzahl von Passagierungen verlieren primäre zerebrale Endothelzellen ihre BHS-Marker (Reichel *et al.*, 2003). Beispielsweise konnten Stins und Kollegen zeigen, dass primäre HBMECs nach acht Passagen ihre spezifischen Marker verloren (Stins *et al.*, 1997). Von einer Zelllinie erwartet man eine hohe Passagenzahl und eine gleichbleibende Markerexpression. Mit diesem Ziel wurden primäre HBMEC mittels des SV40-LT transfiziert und immortalisiert (Stins *et al.*, 2001). Überprüft wurde die Fähigkeit zur Aufnahme von acetyliertem low density lipoprotein (AcLDL) oder das Vorhandensein der  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase ( $\gamma$ GT) als spezifischen zerebralen Endothelmarker. Schließlich wurde das Modell durch die vergleichende Analyse der Transmigration von *E. coli* K1 und HB101 sowie *Citrobacter freundii* als Infektionsmodell etabliert (Stins *et al.*, 2001). Seither findet das HBMEC BHS-Modell mit immortalisierten Zellen Anwendung bei der Untersuchung von potentiellen ZNS-Invasoren wie *S. pneumoniae* (Zysk *et al.*, 2001), *N. meningitidis* (Schubert-Unkmeir *et al.*, 2007), *C. albicans* (Jong *et al.*, 2001), *T. b. rhodesiense* (Nikolskaia *et al.*, 2006a; 2008) und anderen.

Die Zelllinie ECV304 wurde ursprünglich von Takahashi und Kollegen als spontan transformierte Endothelzelllinie publiziert (Takahashi *et al.*, 1990; 1991; 1992). Durch DNA-Fingerprinting-Methoden bei der DSMZ zeigten die ECV304-Zellen ein identisches Bandenmuster wie die T24 Zelllinie, die einem Blasenkarzinom entstammt (Dirks *et al.*, 1999).

Funktionale Untersuchungen und der Nachweis verschiedener Endothelmarker zeigten zum einen das Vorhandensein bestimmter Endothelmarker bei ECV304, die bei T24 nicht gefunden wurden. Zum anderen exprimierten beide Zelllinien Cytokeratine, welche als Epithelmarker verwendet werden (Suda *et al.*, 2001). Vergleichende Untersuchungen bezüglich der Fähigkeit auf induktive Signale von Astrozyten hin eine dichtere Barriere zu generieren, belegten, dass T24-Zellen im Gegensatz zu ECV304 nur schwach auf die Induktion reagierten (Tan *et al.*, 2001). Mittlerweile wird die ECV304-Zelllinie als „endothelartig“ bezeichnet und weiterhin verwendet. Ergebnisse, die mit dieser Zelllinie erzielt werden, müssen vor diesem Hintergrund betrachtet werden und es ist umso mehr von Bedeutung, auf das Vorhandensein der für die spezifische Anwendung notwendigen Charakteristika zu achten. Diesbezüglich wurde in dieser Arbeit die Expression des Lamininrezeptors sowohl in den ECV304-Zellen als auch in den HBMEC-Zellen nachgewiesen. Der Lamininrezeptor ist als Zielstruktur für bakterielle Adhärenz im Fall von *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* und *H. influenzae* vermutlich verantwortlich für den ZNS-Tropismus dieser Meningitiserreger (Orihuela *et al.*, 2009). Ein weiterer Meningitiserreger, *E. coli* K1, bindet ebenfalls über „cytotoxic necrotizing factor 1“ (CNF1) den Lamininrezeptor (Chung *et al.*, 2003). Die Invasion von *S. agalactiae* in HBMECs steht möglicherweise auch im Zusammenhang mit dem Lamininrezeptor. Die Bakterien binden über ein Laminin-Bindungsprotein (Lmb) an HBMEC-Zellen und invadieren in diese (Tenenbaum *et al.*, 2007).

In dieser Arbeit wurde das optimierte ECV304-C6 BHS-Modell auch hinsichtlich der Translokation von Arzneistoffen untersucht. Die Arzneistoffpermeabilitäten von Propranolol, Koffein, Acetaminophen, Carbamezepin, Indometacin und Cimetidin wurden bestimmt und als log *BB*, dem Verteilungsgleichgewicht zwischen Blut und CSF angegeben. Der Nachweis der Arzneistoffe konnte in dem verwendeten Zellkulturmedium erfolgreich durchgeführt werden (Kuehne *et al.*, 2011). Während die Werte der übrigen Arzneistoffe gut mit den Literaturwerten übereinstimmten, wurde für Propranolol eine stärkere Abweichung festgestellt. *In vivo* gelangt Propranolol aufgrund seiner Membrangängigkeit sehr schnell ins Gehirn (Olesen *et al.*, 1978) und hat daher einen positiven log *BB*-Wert in der Literatur. Die Konzentration von Propranolol im Gehirn sinkt allerdings ebenso schnell wieder ab. Gründe hierfür sind der aktive Efflux über den Pgp-Transporter im zerebralen Endothel und der Abbau in der Leber. Da ECV304-Zellen Pgp exprimieren (Dolman *et al.*, 1997), überwiegt möglicherweise der Effluxeffekt im ECV304-C6 BHS-Modell. Für Cimetidin konnte kein log

*BB*-Wert bestimmt werden, da eine Translokation von Cimetidin nicht nachgewiesen werden konnte. Cimetidin transloziert *in vivo* sehr schlecht über die BHS, daher kann man in diesem Fall ebenfalls von einer guten Korrelation von gemessenen und Literaturwerten sprechen. Insgesamt zeigte das optimierte ECV304-C6 BHS-Modell eine gute Korrelation von gemessenen Arzneistoffpermeabilitäten mit Werten aus der Literatur. Daher eignet sich das optimierte ECV304-C6 BHS-Modell für kombinierte Studien mit Pathogenen und Wirkstoffen. Besonders interessant wären Untersuchungen mit Trypanosomen, den Schlafkrankheitsmedikamenten und deren Auswirkungen auf den Transmigrationsprozess. Möglicherweise ließen sich in einem solchen Modellsystem Grundlagen für Therapieverbesserungen legen.

Die in dieser Arbeit verwendeten BHS-Modelle basieren auf einer oder zwei Zelllinien in einem transwellbasierten System. In der Literatur finden sich auch komplexere Modellsysteme, die weitere Zellarten, wie Perizyten, implementieren. Perizyten, die ebenfalls eng mit zerebralen Endothelzellen assoziiert sind (Abbott, 2005), können auch BHS Eigenschaften in Endothelzellen induzieren (Nakagawa *et al.*, 2007) und ein in diesem Prozess beteiligter Faktor ist TGF- $\beta$  (Dohgu *et al.*, 2005). Beispielsweise entwickelten Nakagawa und Kollegen ein transwellbasiertes BHS-Modell mit primären Endothelzellen, Astrozyten und Perizyten, in welchem die Aufsummierung der induktiven Signale von Astrozyten und Perizyten zu einem dichten BHS-Modell führte (Nakagawa *et al.*, 2007; 2009). Mit drei verschiedenen Zelltypen ist derzeit die maximale Komplexität eines transwellbasierten BHS-Modells erreicht. Komplexere Systeme beschäftigen sich mit dem 3D-Modelling, um der *in vivo* Situation näherzukommen und sind beispielsweise in der Lage in einem Durchflussverfahren die Strömungssituation eines Blutgefäßes zu simulieren (Stanness *et al.*, 1997). Letztendlich hängt die Auswahl des verwendeten BHS-Modells immer von der zu untersuchenden Fragestellung ab, denn kein Modellsystem gibt die *in vivo* Situation exakt wieder. Die in dieser Arbeit verwendeten BHS-Modelle, das optimierte ECV304-C6 System und das HBMEC-Modell, wurden ausgewählt, da diese reproduzierbare BHS-Barrieren bilden und leicht zugängliche Zelllinien verwenden. Diese sind als transwellbasierte Modelle geeignet, die Transmigration von Trypanosomen und von Streptokokken zu untersuchen.

## 5.2 TRANSMIGRATION VON TRYPANOSOMEN

Die humane afrikanische Schlafkrankheit wird von den Arten *T. b. gambiense* und *T. b. rhodesiense* verursacht. Besonders gefährdet ist die ländliche Bevölkerung, die während ihren Aktivitäten wie Ackerbau, Viehzucht und Jagd dem Vektor gegenüber exponiert ist. Die Trypanosomen werden bei einem Biss der Tsetsefliege übertragen. Die Erfolgschancen einer Behandlung sind in der ersten, hämolympathischen Phase am größten, allerdings sind die ersten Krankheitssymptome mild und unspezifisch. Das aktive Screening in betroffenen Gebieten ist daher eine der wichtigsten Maßnahmen, um die Schlafkrankheit frühzeitig zu erkennen und einzudämmen. Ein weiterer Aspekt der Früherkennung ist, dass die Phase 1 Behandlung durch trainiertes Personal in den Dörfern oder in kleineren Gesundheitszentren erfolgen kann. Die Behandlung der zweiten, meningoenzephalitischen Phase erfordert spezialisiertes Personal in größeren Krankenhäusern (WHO, 2010). Der Eintritt in die zweite Phase ist gekennzeichnet durch eine Störung des Wach-Schlafrhythmus, Verhaltensänderungen und schließlich Apathie, Koma und Tod (Lang & Löscher, 2000). Die neurologischen Symptome stehen auf noch nicht geklärte Weise in Zusammenhang mit der trypanosomalen Infektion des ZNS. Um in das ZNS zu gelangen, überwinden die Trypanosomen die BHS. Auch dieser Prozess ist erst ansatzweise verstanden (Grab & Kennedy, 2008). Ein guter Ansatzpunkt, um den Prozess der Transmigration über die BHS aufzuklären, ist die Verwendung von *in vitro* Modellen der BHS. Diese ermöglichen einen direkten Eingriff in zelluläre und molekulare Mechanismen. Das in dieser Arbeit verwendete optimierte ECV304-C6 Modellsystem erwies sich als geeignet, um die Transmigration verschiedener Trypanosomenstämme zu vergleichen.

Grundlage für aussagekräftige Transmigrationsversuche sind optimale Kulturbedingungen für die Trypanosomenstämme. Die humanpathogenen Stämme *T. b. gambiense* STIB930 und *T. b. rhodesiense* STIB900 wurden von Prof. Brun, STI in Basel zur Verfügung gestellt und bedurften zunächst einer Adaptation an die neuen Medien, die andere Serumchargen enthielten. Diese Adaptation wurde schon früher beschrieben (Untucht, 2007). Tauchen während der Kultur dennoch Probleme wie schlechtes Wachstum auf, kann die Erhöhung des Serumanteils das Wachstum der Trypanosomenkultur verbessern. Generell ist die kontinuierliche Verwendung frisch angesetzter Medien notwendig. Trotz der Verwendung verschiedener Medienzusammensetzungen in dieser Arbeit wurden im Fall der humanpathogenen Stämme nicht die Wachstumsraten erreicht, die *T. b. brucei* TC221

aufweist. Bei Zelldichten von  $7 \cdot 10^5$  Trypanosomen /mL zeigten sich fatale Veränderungen in der Trypanosomenmorphologie wie aufgeblähte Vakuolen oder Zellaggregationen. Derartige Veränderungen korrelierten mit stark verringerten Transmigrationsraten der Trypanosomen im Transmigrationsversuch und der Versuch wurde verworfen. Um eine gute Fitness der Trypanosomenkultur am Versuchstag zu gewährleisten, wurden die Kulturen täglich mikroskopisch kontrolliert und die Splittraten wurden an die Zelldichte angepasst. Laut Angaben des STI ist der STIB930 Stamm schwieriger zu kultivieren als STIB900 (Frau Monika Cal, STI; persönliches Gespräch). Dies zeigte sich darin, dass der Stamm STIB930 phasenweise gute Wachstumsraten zeigte, während der Stamm STIB900 zunächst eine lange Startphase von ca. zwei bis drei Wochen nach dem Auftauen benötigte, sich danach aber kontinuierlich gut vermehren ließ. Van Reet und Kollegen beschrieben kürzlich ein Medium für *T. b. gambiense* mit Humanserum und Methylzellulose, mit welchem sie Zelldichten von über  $10^6$  Trypanosomen /mL erreichten (Van Reet *et al.*, 2011). Die Etablierung eines solchen Mediums würde den Aufwand und die Materialkosten für Versuchsreihen, die eine große Menge an Trypanosomen benötigen, wesentlich reduzieren.

Neben der Optimierung verschiedener Kulturmedien wurden verschiedene Infektionsmedien evaluiert. Die Transmigrationsversuche mit der optimierten ECV304-C6 BHS wurden in serumfreiem Q286 durchgeführt und zu anfangs stellte sich die Frage, wie sich dieses Medium auf die Trypanosomen auswirkt. In Versuchsreihen mit verschiedenartig zusammengestellten Infektionsmedien erwies sich Q286 als ideales Infektionsmedium für eine Inkubationszeit von 6 h. Innerhalb dieser Zeitspanne blieb die Zellzahl der Trypanosomen konstant, sodass bei der Auswertung der Transmigrationsversuche tatsächlich transmigrierte Trypanosomen gezählt wurden. Es konnte ausgeschlossen werden, dass nur wenige Trypanosomen transmigrierten und sich anschließend stark vermehrten oder dass die Anzahl transmigrierter Trypanosomen durch ein starkes Absterben verringert wurde. Letztendlich ist die Verwendung des Q286-Zellkulturmediums als Infektionsmedium auch für die BHS Zellen ideal, da die Zellen nicht durch eine andere Medienzusammenstellung beeinflusst wurden. Insbesondere die Variation des Serumanteils kann sich unterschiedlich auf die Dichtigkeit einer BHS auswirken (z.B. zusammenfassend dargestellt in (Deli *et al.*, 2005)).

Die Verwendung optimaler Kulturbedingungen ist eine Voraussetzung für reproduzierbare Transmigrationsversuche. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Trypanosomenstämme

verwendet. Zwei dieser Stämme, *T. b. gambiense* STIB930 und *T. b. rhodesiense* STIB900, sind humanpathogen. Der dritte Stamm *T. b. brucei* TC221 ist tierpathogen und kann bei Rindern die Naganaseuche auslösen. Für die Untersuchung der Transmigration über das optimierte ECV304-C6 BHS-Modell wurde i.d.R. ein Inokulum von  $10^6$  Trypanosomen pro BHS-Einsatz verwendet. Das eingesetzte Inokulum entspricht  $3,3 \cdot 10^6$  Trypanosomen /mL und ist physiologisch relevant, da *T. b. rhodesiense* Infektionen im Menschen hohe Parasitämien von  $10^6$  Trypanosomen /mL verursachen (Vanhollebeke *et al.*, 2006). In einem Modellsystem mit grünen Meerkatzen erreichte *T. b. rhodesiense* Blutkonzentrationen von bis  $10^8$  Trypanosomen /mL (Thuita *et al.*, 2008). Im Mausmodell können ebenfalls Konzentrationen von bis zu  $10^8$  Trypanosomen /mL Blut nachgewiesen werden (Herbert & Lumsden, 1976). *T. b. gambiense* Infektionen zeigen im Menschen niedrige Parasitämien von  $10^3$  bis  $10^4$  Trypanosomen /mL Blut (Chappuis *et al.*, 2005). Diese geringen Konzentrationen sind als Inokuli allerdings *in vitro* nicht praktikabel, da die Nachweisgrenze bei mikroskopischen Zählungen bei ca.  $5 \cdot 10^3$  Trypanosomen /mL und Probe liegt.

Die Untersuchung der Transmigration über das optimierte ECV304-C6 BHS-Modell ergab, dass sämtliche Stämme bei einem Inokulum von  $10^6$  Trypanosomen pro BHS-Einsatz die ECV304-C6 BHS überwand. Während *T. b. gambiense* STIB930 signifikant stärker über das BHS-Modell transmigrierte, wies *T. b. rhodesiense* STIB900 eine geringere Transmigrationsrate auf. Für *T. b. brucei* TC221 wurde die geringste Transmigrationsrate festgestellt. *In vivo* ist *T. b. brucei* nicht humanpathogen, da er für die trypanolytischen Faktoren (TLF) in humanem Blut anfällig ist. Von allen bekannten Trypanosomenarten sind nur *T. b. gambiense* und *T. b. rhodesiense* resistent gegen die TLFs (Pays *et al.*, 2006). Fehlen diese Faktoren, sind auch andere Trypanosomenarten in der Lage den Menschen zu infizieren. In Indien zum Beispiel wurde 2005 von einer *T. evansi* Infektion bei einem Bauern berichtet. In seinem Blut wurde eine hohe Parasitämie von  $10^6$  Trypanosomen /mL festgestellt. Diese hohen Werte sind für die akute Form der afrikanischen Schlafkrankheit ausgelöst durch *T. b. rhodesiense* charakteristisch (Vanhollebeke *et al.*, 2006). Vanhollebeke und Kollegen konnten zeigen, dass das Serum des *T. evansi*-infizierten Patienten keine trypanolytische Aktivität aufwies. Weiterhin konnten „frameshift“-Mutationen im Genom des Patienten in beiden Allelen für den TLF APOL1 nachgewiesen werden. Durch die Zugabe von rekombinantem APOL1 konnte die trypanolytische Aktivität des Serums wiederhergestellt werden. Als Ursache der Erkrankung konnte demnach das Fehlen des TLF APOL1 im Serum durch einen genetischen



Defekt festgestellt werden (Vanhollebeke *et al.*, 2006). Möglicherweise ist *T. b. brucei* auch in der Lage Infektionen im Menschen zu verursachen, wenn der TLF APOL1, wie im Transmigrationsversuch, fehlt. *T. b. brucei* zeigte in anderen Studien mit dem HBMEC-Modell ebenfalls eine Transmigration (Nikolskaia *et al.*, 2006a). Auch *in vivo* überwindet *T. b. brucei* bei Tieren die Endothelbarrieren (Losos & Ikede, 1972) und kann beispielsweise in Mäusen und Ratten das ZNS infizieren (Berriman *et al.*, 2005; Grassi-Zucconi *et al.*, 1996; Masocha *et al.*, 2008). Eine interessante Beobachtung beschrieben Masake und Kollegen. Offenbahr kann *T. b. brucei* die BHS von Rindern nur während einer Koinfektion mit *T. congolense* überwinden (Masake *et al.*, 1984). Derartige Koinfektionen könnten auch im ECV304-C6 BHS-Modell untersucht werden. Die Auswertung der transmigrierten Trypanosomen könnte mit Hilfe artspezifischer Fluoreszenzmarker im FACS erfolgen. Entsprechende Fluoreszenzmarker wurden von Balmer und Kollegen beschrieben (Brun & Balmer, 2006). Neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der Rindertrypanosomiasis führen möglicherweise zu verbesserten Therapiestrategien. Diese sind notwendig, da die wirtschaftlichen Schäden in der afrikanischen Landwirtschaft durch die Rindertrypanosomiasis enorm sind (Kristjanson, 1999). Bei der Untersuchung der trypanosomalen Transmigration über die optimierte ECV304-C6 BHS in dieser Arbeit wurden auch die Auswirkungen einer Erhöhung des Inokulums untersucht. Die Erhöhung von  $10^6$  auf  $10^7$  Trypanosomen pro BHS-Einsatz führte zu einer signifikanten Erhöhung der Transmigrationsraten bei *T. b. rhodesiense* STIB900 und *T. b. brucei* TC221. Hingegen überwand *T. b. gambiense* STIB930 nur unwesentlich stärker die ECV304-C6 BHS. Bei dem erhöhten Inokulum hatten alle drei Trypanosomenarten eine vergleichbare Transmigrationsrate von ca.  $2 \cdot 10^4$  Trypanosomen /mL. Vergleicht man die Menge transmigrierter Trypanosomen mit dem verwendeten Inokulum, transmigrieren nur etwa 0,5 % des Inokulums. Dies ist möglicherweise ein Indiz dafür, dass zum einen die Integrität der ECV304-C6 BHS trotz einer hoher Trypanosomendichte erhalten bleibt. Zum anderen könnte es ein Hinweis darauf sein, dass es bislang unbekannte Faktoren gibt, die die Transmigrationsrate limitieren.

Ob Trypanosomen die BHS schädigen oder ob ausschließlich inflammatorische Prozesse für den Zusammenbruch der BHS-Integrität verantwortlich sind, lässt sich nicht eindeutig beantworten. Grab und Kollegen konnten mit Echtzeit-TEER Messungen zeigen, dass die TEER-Werte während der Transmigration abfielen, sich aber wieder erholten (Grab *et al.*, 2004). Diese Beobachtung spricht dafür, dass die Trypanosomen die TJ kurzfristig öffnen und

zwischen den Zellen hindurch die BHS überwinden. Die trypanosomale ZNS-Infektion löst inflammatorische Prozesse aus, die ebenfalls Einfluss auf die BHS-Permeabilität haben. Untersuchungen zeigen, dass sich die parazelluläre Permeabilität durch inflammatorische Prozesse ohne dauerhafte Schäden kurzfristig erhöhen kann (Huber *et al.*, 2001). Auch die parazelluläre Transmigration von Neutrophilen (Burns *et al.*, 1997; 2000) und Monozyten (Giri *et al.*, 2000) über die BHS erfolgt ohne einen Abbau der TJ. Kürzlich veröffentlichte Studien mittels „magnetic resonance imaging“ (MRI) zeigten jedoch, dass bei mit *T. b. rhodesiense* infizierten Mäusen Schäden an der BHS auftreten, die nicht nur eine Folge von inflammatorischen Prozessen, sondern auch direkt eine Folge der trypanosomalen Transmigration sein könnten (Grab *et al.*, 2004).

Im *in vitro* Modell, das die Faktoren des Immunsystems nicht berücksichtigt, bleibt die Integrität der BHS erhalten und es zeigte sich, dass die trypanosomale Transmigration über die ECV304-C6 BHS möglicherweise limitiert ist. Ein potentieller Faktor für diese Limitierung ist die Adhärenz der Trypanosomen an die Zellen. Für die Transmigration über die BHS ist zunächst eine Interaktion in Form von löslichen Faktoren mit oder eine Adhäsion an bestimmte Zelloberflächenmoleküle nötig. Bei einem hohen Inokulum von  $10^7$  Trypanosomen /mL sind die möglichen Adhärenzstrukturen pro Trypanosom stark begrenzt. Dies ergibt sich aus der Überlegung, dass bei diesem Inokulum  $10^7$  Trypanosomen auf eine Transwelleinsatzfläche von  $0,33 \text{ cm}^2$  absinken. Zwar sind die Trypanosomen stark bewegungsaktiv, sammeln sich jedoch in Kultur stets am Boden an. Geht man weiterhin davon aus, dass ein Trypanosom auf einer Körperlänge von  $5 \text{ }\mu\text{m}$  etwa  $1 \text{ }\mu\text{m}$  breit ist, ergibt sich für ein Trypanosom eine Fläche von  $5 \text{ }\mu\text{m}^2$ . Würden sich  $10^7$  Trypanosomen gleichmäßig, benötigten sie dafür eine Fläche von  $0,5 \text{ cm}^2$ . Teilt man die benötigte Fläche durch die vorhandene Fläche, ergibt sich eine theoretische Trypanosomenschichtdicke von ca. 1,5. Das bedeutet, dass mindestens ein Drittel der Trypanosomen überhaupt nicht mit der Oberfläche der Endothelzellschicht in Kontakt tritt. Dies ist möglicherweise ein Grund für die beobachtete Transmigrationslimitation.

Die Adhärenz der Trypanosomen an die Endotheloberfläche geht der Transmigration voraus und als potentielles Interaktionsmolekül auf Zelloberflächen wurde das ECM-Molekül  $\alpha 4$ -Laminin identifiziert (Masocha *et al.*, 2004). Die  $\alpha 4$ -Lamininkette ist Bestandteil von Laminin 8, das in den Basallaminae von Endothelzellen vorkommt (Sixt *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu Basallaminae mit  $\alpha 5$ -Laminin können Trypanosomen Basallaminae mit  $\alpha 4$ -Laminin

transmigrieren und die BHS überwinden (Masocha *et al.*, 2004). Leukozyten können ebenfalls die Blutgefäße in Bereichen mit  $\alpha$ 4-Laminin verlassen und zum Entzündungsherd vorstoßen (Owens *et al.*, 2008). Beispielsweise folgen T-Zellen den Trypanosomen im Mausmodell über die BHS in den perivaskulären Raum (Sixt *et al.*, 2001). Basallaminae mit anderen Lamininisoformen wie  $\alpha$ 5-Laminin sind im Mausmodell für T-Zellen ebenfalls nicht permeabel (Masocha *et al.*, 2004; Sixt *et al.*, 2001).

Prinzipiell gibt es den parazellulären Weg zwischen den Zellen hindurch und den transzellulären Weg durch die Zelle, um die BHS zu überwinden. Mulenga und Kollegen infizierten Ratten mit *T. b. brucei* und beobachteten, dass die TJ nicht abgebaut wurden und vermuteten daher eine transzelluläre Transmigration (Mulenga *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass trotz hoher Inokulation mit Trypanosomen, die BHS Integrität nicht verloren ging. Setzte man eine Degradation von TJ voraus käme man zum gleichen Schluss wie Mulenga und Kollegen. Jedoch konnten Grab und Kollegen zeigen, dass *T. b. gambiense* in der Nähe von Zellgrenzen adhäriert und die BHS parazellulär überwindet (Grab *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Trypanosomen in ECV304-C6 BHS-Einsätzen angefertigt. Zunächst fiel auf, dass trotz eines hohen Inokulums kaum Trypanosomen auf den ECV304-Zellen vorhanden waren. Der Grund für diese Beobachtungen könnte in der Fixierungstechnik liegen, doch bei der genauen Analyse der Trypanosomen, die auf der ECV304-Zellschicht gefunden wurden, stellte sich heraus, dass sie mit Zellgrenzen assoziiert waren. Möglicherweise konnten die Trypanosomen an den Zellgrenzen adhären und wurden bei der Fixierung fest mit den ECV304-Zellen verbunden. Die nicht adhärenen Trypanosomen sind vermutlich bei Waschschritten nach der Fixierung weggespült worden.

Wie bereits erwähnt, konnte bei Leukozyten und Trypanosomen beobachtet werden, dass  $\alpha$ 4-Lamininen in der Basallamina für ihre Transmigration über die BHS wichtig sind. Masocha und Kollegen untersuchten in RAG-1 defizienten Mäusen, die keine B- und T-Zellen ausbilden, die Transmigration von Trypanosomen über die BHS und stellten fest, dass ohne diese Lymphozyten keine trypanosomale Transmigration ins ZNS stattfand (Masocha *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Trypanosomen ähnliche Mechanismen wie die Leukozyten zur Transmigration über die BHS verwenden oder aber dass die Transmigration dieser Zellen die trypanosomale Transmigration erst ermöglicht. Denkbar ist auch, dass die Trypanosomen als Passagiere intrazellulär in Leukozyten die BHS überwinden. Diese Variante

wird als „trojan horse theorie“ bezeichnet. Um zu überprüfen, ob diese Mechanismen für die trypanosomale Transmigration von Relevanz sind, wurde die Kotransmigration von J774-Makrophagen und *T. b. brucei* TC221 über die ECV304-C6 BHS untersucht. In einem Vorversuch zeigte sich, dass die verwendeten J774-Makrophagen die ECV304-C6 BHS überwinden können und dass dies unabhängig von dem Aktivierungsstatus der Makrophagen ist. Interessanterweise konnten die J774-Makrophagen eine BHS-zellfreie Matrigelschicht nicht überwinden. Im Gegensatz dazu überwandern sie die matrigelhaltige ECV304-C6 BHS und BHS-zellfreie Transwelleinsätze ohne Matrigel problemlos. Eine Erklärung wäre, dass die ECV304-Zellen Strukturen anbieten, die die Makrophagen zur Transmigration stimulieren und in Folge dessen können die Makrophagen die Matrigelschicht überwinden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die ECV304-Zellen das Matrigel modifizieren und es kein Hindernis mehr darstellt. In diesem Zusammenhang spielen möglicherweise Matrix-Metalloproteasen (MMP) eine Rolle. MMPs können verschiedene Komponenten der ECM abbauen und sind Angriffspunkte zur Regulation der BHS Permeabilität. Des Weiteren fördern sie die Exvasation von Leukozyten (Cardoso *et al.*, 2010). Endothelzellen und Astrozyten können MMPs sezernieren (Wolburg *et al.*, 2009) und die Untersuchung der Rolle von MMPs bei der Transmigration von Makrophagen und Trypanosomen über die BHS wäre sicherlich ein spannendes Forschungsprojekt.

Die Untersuchung der Kotransmigration von J774-Makrophagen und *T. b. brucei* TC221 ergab, dass Trypanosomen keinen Einfluss auf die Transmigration der Makrophagen hatten. Allerdings sank die Transmigration der Trypanosomen in Gegenwart der Makrophagen signifikant ab. In einem Kokultivierungsversuch konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Makrophagen keinen trypanoziden Effekt haben, der eine Verringerung der trypanosomalen Transmigration durch Abtöten erklären würde. Möglicherweise haben die Makrophagen eine höhere Affinität zu potentiellen Transmigrationsstellen als die Trypanosomen und verringern auf diese Weise die Transmigration der Trypanosomen über die BHS. Auf jeden Fall ergibt sich aus den Beobachtungen, dass die J774-Makrophagen keine unspezifischen Löcher in der ECV304-C6 BHS hinterlassen, die die Trypanosomen für die Transmigration nutzen könnten. Intrazelluläre Stadien von Trypanosomen in Makrophagen konnten bei der mikroskopischen Bestimmung der transmigrierten Makrophagen nicht festgestellt werden. Dies ist ein Indiz dafür, dass auch die „trojan horse theory“ in diesem Fall nicht zutrifft. Wären Trypanosomen von den Makrophagen internalisiert worden hätte sich die Transmigration der Makrophagen

möglicherweise aufgrund einer geringeren Adhäsionsfähigkeit verringert. Diese Vermutung beruht auf Beobachtungen von Da Gama und Kollegen, die zeigen konnten, dass J774-Makrophagen, die mit *T. gondii* infiziert waren, weniger an Kollagen IV, Fibronectin und Laminin banden als uninfizierte Makrophagen (Da Gama *et al.*, 2004). Ein weiterer Aspekt bei der „trojan horse theory“ ist die Fähigkeit, dass die Pathogene zumindest kurzfristig intrazellulär überleben können. Afrikanische Trypanosomen sind jedoch extrazelluläre Parasiten im Gegensatz zu der südamerikanischen Art *T. cruzi*, die sich innerhalb menschlicher Zellen vermehren (Despommier *et al.*, 2005). Zwar finden sich in der Literatur Hinweise auf intrazelluläre afrikanischen Trypanosomen in HBMECs (Nikolskaia *et al.*, 2006b) und in Gliazellen und Astrozyten von infiziertem *ex vivo* ZNS-Gewebe (Stoppini *et al.*, 2000) aber die pathomechanistische Relevanz wird als gering eingeschätzt.

Als extrazelluläre Parasiten vermehren sich die Trypanosomen im Blutkreislauf. Die Invasion des ZNS markiert den Übergang zur meningoenzephalitischen Phase der afrikanischen Schlafkrankheit und erfordert die Verwendung BHS-gängiger Medikamente. Daher ist die richtige Einordnung in die Phasen wichtig, um einer rezidivierenden Erkrankung vorzubeugen. Im Ratteninfektionsmodell konnte gezeigt werden, dass nach dem Abtöten der Trypanosomen im Blutstrom durch nicht BHS-gängige Medikamente Trypanosomen aus dem ZNS die Blutbahn reinfizieren konnten (Jennings *et al.*, 1979). Ergebnisse dieser Arbeit mit dem ECV304-C6 BHS-Modell haben bestätigt, dass die Trypanosomen den umgekehrten Weg von der ZNS-Seite über die BHS auf die Blutstromseite nehmen können (**Abb. 5.1**, S. 168). Für diese Untersuchungen wurde ein inverses BHS-Modell entworfen, bei dem die C6-Zellen innerhalb des Transwelleinsatzes und die ECV304-Zellen auf der Transwellmembranunterseite kultiviert wurden. Bei den Transmigrationsuntersuchungen stellte sich heraus, dass die drei Trypanosomenstämme die inverse ECV304-C6 BHS überwinden konnten. *T. b. gambiense* STIB930 transmigrierte mit einer signifikant höheren Transmigrationsrate als *T. b. rhodesiense* STIB900 und *T. b. brucei* TC221. Die beiden letzteren zeigten ähnliche Transmigrationsraten. Das Transmigrationsverhalten der getesteten Trypanosomenstämme ist sowohl im ECV304-C6 BHS-Modelle, als auch im inversen ECV304-C6 BHS-Modell ähnlich. In beiden Modellen zeigte *T. b. gambiense* STIB930 die stärkste Transmigration. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass das ZNS als Rückzugsgebiet für Trypanosomen dienen kann. Nach der Überwindung der BHS sind die

Trypanosomen nicht nur vor der humoralen Immunantwort des Wirtes, sondern auch vor nicht BHS-gängigen Antiparasitika geschützt.

Die Überwindung der BHS durch die afrikanischen Trypanosomen erfolgt bidirektional und es stellen sich Fragen nach den molekularen Mechanismen und wie in diese zwecks Therapieentwicklung eingegriffen werden kann. Die für den Transmigrationsprozess notwendigen Virulenzfaktoren und deren Wirkmechanismen sind bisher nur zum Teil aufgeklärt. Trypanosomen können eine Reihe verschiedener Hydrolasen exprimieren, die sie auf ihrer Oberfläche tragen oder in die Umgebung sezernieren. Derartige Enzyme sind möglicherweise am Transmigrationsprozess beteiligt (Lonsdale-Eccles & Grab, 2002). Auf der Zelloberfläche von *T. b. brucei* (Bakalara *et al.*, 2000) und *T. b. rhodesiense* (McLaughlin, 1986) sind beispielsweise saure Phosphatasen exponiert. Saure Phosphatasen wurden auch auf invasiven Zellen in Krebserkrankungen gefunden (Schenk & Konrad, 1980). Bisher gibt es allerdings keine Erkenntnisse, ob solche Phosphatasen eine Rolle bei der trypanosomalen Gewebeeinfiltration eine Funktion haben. Zu den sezernierten Hydrolasen gehören die Oligopeptidase B (Morty *et al.*, 1999) und mehrere Cysteinproteasen, die als Trypanopaine bezeichnet werden (Lonsdale-Eccles & Grab, 2002). Im Genom von *T. brucei* finden sich zwei Arten Cysteinproteasen. Ein Gen kodiert für eine Cathepsin-B ähnliche Protease und elf weitere Gene kodieren eine Familie von Cathepsin-L ähnlichen Proteasen, die Brucipaine genannt werden (Berriman *et al.*, 2005). Im Jahr 2006 konnten Nikolskaia und Kollegen zeigen, dass Brucipaine für die Transmigration über die BHS eine wichtige Funktion übernehmen. Durch die Verwendung eines spezifischen Brucipaininhibitors konnte die Transmigration über die HBMEC BHS von *T. b. gambiense* um ca. 50 % verringert werden. Weiterhin konnten wiesen sie nach, dass neben der humanpathogenen Art *T. b. rhodesiense* auch *T. b. brucei* Brucipaine in den Überstand sezerniert und über das BHS-Modell transmigriert, wenn auch in geringerem Maße (Nikolskaia *et al.*, 2006a; 2008).

Als Zielstruktur für die sezernierten Brucipaine vermuten Grab und Kollegen „protease activated receptors“ (PARs) auf der Zelloberfläche von HBMECs und konnten PAR-2 als einen möglichen Interaktionspartner identifizieren. Die PA-Rezeptoren leiten ihre Signale intrazellulär über kleine G-Proteine weiter und können eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung in der Zelle bewirken. Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurden schon früher im Zusammenhang mit einer reversiblen Verringerung des transendothelialen Widerstandes beobachtet (Grab *et al.*, 2004). Grab und Kollegen postulieren eine Brucipain induzierte

Signaltransduktion, die durch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Zellaktivierung die Permeabilität der TJ erhöht und den parazellulären Weg für die Trypanosomen über die BHS möglich macht (Grab & Kennedy, 2008).

Möglicherweise können unterschiedliche Mengen an sezernierten Brucipainen die Unterschiede in der trypanosomalen Transmigration über das optimierte ECV304-C6 BHS-Modell erklären. Die quantitative Untersuchung der Brucipainproduktion und –sekretion von den in dieser Arbeit verwendeten Trypanosomenstämmen wäre eine wichtige Grundlage für weiterführende Arbeiten.

Die Aufklärung eines Pathomechanismus wie die trypanosomale BHS-Transmigration zeigt potentielle Zielstrukturen für die Medikamentenentwicklung auf. Blockiert man die sezernierten Cysteinproteasen oder die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung, wird die trypanosomale Transmigration über HBMECs stark reduziert (Nikolskaia *et al.*, 2006a). In dieser Arbeit wurden ebenfalls drei verschiedene Cysteinproteaseinhibitoren getestet. In allen drei Fällen zeigte sich, dass die Inhibitoren die Transmigration von *T. b. gambiense* STIB930 signifikant verringern konnten. Bezogen auf die DMSO-Kontrolle wurden die Transmigrationsraten um 94-98 % verringert. Vergleicht man die Menge der transmigrierten Trypanosomen der DMSO-Kontrolle mit der Menge transmigrierter Trypanosomen ohne DMSO, zeigte sich, dass die verwendete DMSO-Konzentration keinen Einfluss auf die Transmigration über die ECV304-C6 BHS hatte. Bei der Mikroskopie der BHS-Transwelleinsätze nach 6 h Inkubationszeit mit den Cysteinproteaseinhibitoren wurden im Gegensatz zur DMSO-Kontrolle keine sich bewegendenden Trypanosomen mehr festgestellt. Dies lässt vermuten, dass die Cysteinproteaseinhibitoren nicht nur die Brucipaine inhibieren, sondern auch eine trypanozide Wirkung haben. Die trypanozide Wirkung von Cysteinproteasen wurde bereits früher beschrieben und in Mausversuchen konnten Cysteinproteasen eine erfolgreiche Infektion mit Trypanosomen verhindern (Scory *et al.*, 1999; Troeberg *et al.*, 1999).

Die Untersuchung der Cysteinproteaseinhibitoren im ECV304-C6 BHS-Modell erfolgte in Kooperation mit der AG Prof. T. Schirmeister von der Universität Würzburg. Die verwendeten Inhibitorkonzentrationen wurden in Würzburg nach Rücksprache über die verwendeten Volumina im Transmigrationsversuch so gewählt und eingestellt, dass die Inhibitoren möglichst optimal wirken können. Dies geschah auf der Grundlage der  $K_i$  und  $\text{IC}_{50}$  Werte der Inhibitoren. Möglicherweise wurde die Konzentration doch suboptimal gewählt, sodass die

trypanozide Wirkung zu stark war. Unter der Annahme, dass die Konzentration zu hoch war, wurde die Transmigration trotzdem nicht vollständig inhibiert. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Inhibitoren nicht effektiv genug wirken oder dass es weitere Faktoren gibt, die die Transmigration ermöglichen und die von den Cysteinproteasen unabhängig sind. Für eine Optimierung sicherlich interessant ist die unterschiedlich starke Wirkung der beiden Stereoisomere CS135 und CS138. Weitere Untersuchungen auf dem Gebiet der Cysteinproteaseinhibitoren sind besonders im Hinblick auf die Medikamentenentwicklung sinnvoll. Zur Behandlung der afrikanischen Schlafkrankheit stehen momentan nur wenige Medikamente zur Verfügung und auch in naher Zukunft werden vermutlich keine neuen Medikamente auf den Markt kommen (Kennedy, 2008).

### **5.3 TRANSMIGRATION VON STREPTOKOKKEN**

Zahlreiche Streptokokkenarten sind harmlose Kommensalen bei Menschen und Tieren. Unter bestimmten Voraussetzungen jedoch können einige dieser Arten invasive Erkrankungen hervorrufen (Patterson *et al.*, 1992). Eine besonders schwerwiegende invasive Erkrankung ist die bakterielle Meningitis mit einer hohen Sterblichkeitsrate. Trotz erfolgreicher Therapie leiden viele Überlebende unter neurologischen Langzeitschäden (Tebruegge & Curtis, 2008). Besonders Neugeborene und Kinder unter 5 Jahren sind gefährdet (Kadioglu *et al.*, 2008). In dieser Altersgruppe können Gruppe B Streptokokken und Pneumokokken Erreger einer bakteriellen Meningitis sein. Gruppe B Streptokokken können während der Geburt und auch in der Zeit nach der Geburt durch engen Körperkontakt von der Mutter auf das Kind übertragen werden (Rajagopal, 2009). In der postnatalen Phase tritt auch eine Besiedlung durch Pneumokokken auf und erreicht im Alter von zwei Jahren eine Trägerrate von über 50 %, die danach zunächst wieder etwas absinkt (Weiser, 2010). Bei älteren Menschen ist das Risiko für eine invasive Pneumokokkenkrankung ebenfalls erhöht (NRZ, 2002). Leben Menschen in engem Kontakt zu Tieren, können Streptokokken wie *S. equi ssp. zooepidemicus* auf den Menschen übertragen werden und eine bakterielle Meningitis auslösen (Minces *et al.*, 2011).

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass das optimierte ECV304-C6 BHS-Modell eine selektive Permeabilität für den neuroinvasiven *E. coli* K1 Stamm im Vergleich zu dem nicht invasiven *E. coli* HB101 aufwies, wurden verschiedene Isolate von *S. equi ssp.*



*zooepidemicus*, *S. agalactiae* und *S. pneumoniae* auf ihr Transmigrationsverhalten im optimierten ECV304-C6 BHS-Modell untersucht.

Im Fall von *S. equi* ssp. *zooepidemicus* zeigte das Tierisolat eine geringere Transmigration über die ECV304-C6 BHS als das Isolat aus einem Meningitispatienten, sowohl bezüglich der absoluten Anzahl an transmigrierten CFU /mL als auch in der prozentualen Transmigrationsrate. Dieser Trend ließ sich bei den klinischen Isolaten von *S. agalactiae* nicht bestätigen. Für die Untersuchungen standen insgesamt acht verschiedene Isolate zur Verfügung. Vier dieser Isolate wurden aus Meningitispatienten isoliert, zwei Isolate stammen aus Patienten, die zum Zeitpunkt der Isolierung noch keine Meningitis entwickelt hatten und zwei Stämme wurden in Vaginalabstrichen von gesunden Frauen diagnostiziert. Die Ergebnisse zeigen Transmigrationsraten, die zwischen  $10^4$  CFU /mL und  $10^8$  CFU /mL liegen. Die Meningitisisolate zeigten keine höheren Transmigrationsraten als die aus nicht Meningitispatienten oder als die Isolate von asymptomatischen Trägern. Die ermittelten Werte haben große Standardabweichungen, da die Transmigrationsraten in den einzelnen ECV304-C6 BHS-Einätzen eine starke Heterogenität aufwiesen. Im Vergleich zu den anderen Streptokokken wiesen die Gruppe B Streptokokken die höchste Transmigrationshäufigkeit bei den gleichzeitig niedrigsten Inokuli auf. Sechs von acht Stämmen zeigten eine Transmigrationshäufigkeit von 100 %. Innerhalb der 6 h Infektionszeit wurde in den meisten BHS-Transwelleinsätzen eine Gelbfärbung in der oberen Kammer beobachtet. Dies deutet daraufhin, dass die GBS sich innerhalb dieser Zeit vermehren konnten und möglicherweise auch BHS-Zellen abgestorben sind. Die starke Vermehrung in den BHS-Einätzen ist möglicherweise ein Grund für die hohen Schwankungen der Werte. Eine Veränderung der Inkubationszeit und die Verwendung andere Infektionsmedien könnten eventuell zu einer besseren Reproduzierbarkeit der Werte führen. Ein weiterer methodischer Faktor, der die Untersuchungen beeinflusst haben könnte, tritt bei der Einstellung des Inokulums und der Bestimmung der CFU /mL auf. Möglicherweise gehen durch die kettenförmige Aneinanderreihung der Kokken die CFU nicht immer auf eine einzelne vermehrungsfähige Kokke zurück. Die dadurch entstehende Ungenauigkeit könnte ein Faktor sein, der die Schwankungen in den Werten mit verursacht hat.

Ein weiterer Grund für die hohen Transmigrationsraten und –häufigkeiten liegt wahrscheinlich im Repertoire der GBS-Virulenzfaktoren. GBS sezernieren zwei porenformende Toxine, den Christie Atkins Munch Peterson (CAMP) Faktor (Lang & Palmer, 2003) und das  $\beta$ -

Hämolysin/Zytolysin ( $\beta$ -H/C) (Nizet *et al.*, 1996). Das  $\beta$ -H/C fördert die Invasion in Epithel- und Endothelzellen und erlaubt die Freisetzung aus dem Phagosom durch Wirtszelllyse (Doran *et al.*, 2003). Dieses Toxin ist essentiell für die Entwicklung einer Meningitis und mitverantwortlich für neurologische Folgeschäden (Doran *et al.*, 2003). Als Zielstruktur für die Adhäsion und nachfolgende Invasion der Streptokokken in humane zerebrale Kapillarendothelzellen wurde Laminin identifiziert, welches über ein Laminin-Bindungsprotein (Lmb) gebunden wird. Bei dieser Interaktion spielt möglicherweise auch der in dieser Arbeit auf den ECV304-Zellen nachgewiesene Lamininrezeptor eine wichtige Funktion. Ein wesentlicher Virulenzfaktor der Streptokokken ist auch die Polysaccharidkapsel, die reich an Sialinsäure ist. Durch die Ähnlichkeit zu Sialinsäureresten von Glykanen auf der Zelloberfläche des Wirts, bietet die GBS-Kapsel durch molekulares Mimikry Schutz vor dem Immunsystem. Im Speziellen schützt die Kapsel vor der lytischen Aktivität des Komplementsystems und vor der Opsonophagozytose (Rajagopal, 2009).

Zusammenfassend lässt sich für die Analyse der klinischen GBS-Isolate festhalten, dass bezüglich der Transmigration über die ECV304-C6 BHS keine Korrelation zwischen Isolaten aus Meningitispatienten und anderen Isolaten hergestellt werden konnte.

Die Transmigrationsversuche mit Pneumokokken umfassen den Vergleich von sogenannten „Laborstämmen“ mit klinischen Isolaten. Die Bezeichnung „Laborstämme“ bezieht sich auf die Tatsache, dass die Stämme Serotyp 35A „SPN 37“ und Serotyp 2 „SPN D39“ in zahlreichen Publikationen für Versuche eingesetzt und schon länger in Laboren subkultiviert wurden. Ursprünglich handelt es sich bei diesen Stämmen auch um klinische Isolate. Die in dieser Arbeit als klinische Isolate bezeichneten Stämme sind neuere Patientenisolate und wurden verwendet, um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Krankheitsbild des Patienten und dem Transmigrationsverhalten im *in vitro* Versuch zu untersuchen.

Bei dem Vergleich des Transmigrationsverhaltens der Stämme Serotyp 35A „SPN 37“ und Serotyp 2 „SPN D39“ über die ECV304-C6 BHS fällt auf, dass die Transmigrationsrate von „SPN D39“ geringer als die von „SPN 37“ war. „SPN D39“ überwand signifikant weniger häufig die BHS-Einätze als „SPN 37“. Dieser Unterschied steht möglicherweise in Zusammenhang mit der Bekapselung. Während der Serotyp 35A weniger stark bekapselt ist und eine bessere Adhärenz in *in vitro* Adhäsions und Invasionsversuchen zeigt, ist der Serotyp 2 stärker bekapselt und zeigt eine geringere Adhäsionsfähigkeit im *in vitro* Adhäsionsversuch. *In vivo*

jedoch ist der Serotyp 2 stärker virulent als der Serotyp 35A ist (Kadioglu *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 2007; Watson *et al.*, 1995). Im Vergleich mit einer Gruppe, bestehend aus vier klinischen Isolaten aus Dänemark, zeigen die Laborstämme „SPN 37“ und „D39“ keine besondere Abweichung im Transmigrationsverhalten. Die Gruppe der dänischen Isolate beinhaltet einen „gering invasiven“ Serotyp 1 Stamm „SPN 53“, der innerhalb der sechsstündigen Inkubationszeit nicht transmigrierte und einen „stark invasiven“ Serotyp 23F Stamm „SPN 64“, der die höchste Transmigrationsrate aufwies. Die Transmigrationshäufigkeit dieses Stammes war signifikant höher als die des Serotyp 1 Stammes „SPN 53“ und des Serotyp 6B Stammes „SPN 57“. Der Serotyp 6B ist ebenfalls ein als „stark invasiv“ eingestuftes Patientenisolat, welches eine invasive, systemische Pneumokokkenerkrankung hervorgerufen hat. Um mögliche Unterschiede im Transmigrationsverhalten genauer zu untersuchen, wurde die zeitabhängige Transmigration von Serotyp 1 „SPN 53“ und Serotyp 6B „SPN 57“ im ECV304-C6 BHS-Modell untersucht. Bei dieser Versuchsreihe zeigten sich interessanterweise signifikante Unterschiede in der Transmigrationshäufigkeit nach 6 und 8 h Inkubationszeit. Der „stark invasive“ Serotyp 6B „SPN 57“ wies eine signifikant höhere Transmigrationshäufigkeit als Serotyp 1 „SPN 53“ nach 6 h auf. In diesen Versuchen zeigte „SPN 57“ eine um 1,5 log CFU /mL stärkere Transmigration als in der vorangegangenen Untersuchung, obwohl die Pneumokokken unter standardisierten Bedingungen für die Transmigrationsversuche angezogen und inokuliert wurden. Unterschiede bei der Untersuchung der zeitabhängigen Transmigration wurden für den Serotyp 1 Pneumokokkus beim Vergleich zwischen dem 6 und 8 h Wert festgestellt. Nach 8 h transmigrierte er signifikant häufiger als nach 6 h. Nach 10 h hatte dieser Stamm zwar noch eine leicht geringere Transmigrationsrate als der Serotyp 6B, zeigte jedoch die gleiche Transmigrationshäufigkeit. In dieser Versuchsreihe lässt sich die Tendenz erkennen, dass der „stark invasive“ Stamm stärker transmigriert als der „gering invasive“ Stamm. Dieser Unterschied nur besteht in einem sehr kleinen Zeitfenster und ist zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr festzustellen. Ein Grund hierfür ist vermutlich die Vermehrung der Pneumokokken im Infektionsmedium mit der Folge, dass die Ansäuerung des Mediums und die mögliche Anreicherung von durch Pneumokokken freigesetztes Pneumolysin im Überstand zu einer generellen Schwächung der BHS Integrität führt. Pneumolysin verursacht als Zytotoxin beispielsweise eine Disintegration von „tight junctions“ in Alveolarepithelzellen (Rayner *et al.*, 1995). In Studien mit primären HBMECs löst Pneumolysin einen Zusammenbruch des transendothelialen Widerstandes und das Ablösen

der Zellen vom Untergrund aus (Zysk *et al.*, 2001). Weitere Faktoren, die an einer generellen Zellschädigung durch Pneumokokken beteiligt sein könnten, sind die Freisetzung von Wasserstoffperoxid (Duane *et al.*, 1993) und die Hyaluronidase. Dieses Enzym führte in Kombination mit Pneumolysin zu einer Zellschädigung (Feldman *et al.*, 2007).

In den bisherigen Versuchen konnte nur in Einzelfällen eine Korrelation zwischen der klinisch festgestellten Invasivität der Pneumokokken und dem Transmigrationsverhalten über das ECV304-C6 BHS-Modell festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde eine weitere Gruppe neuerer klinischer Isolate im HBMEC BHS-Modell untersucht. Während bisher die untersuchten Isolate verschiedene Serotypen aufwiesen, waren die neueren Isolate Serotyp 7F Stämme, die weltweit verstärkt auftreten (McIntosh & Reinert, 2011; Nuorti & Whitney, 2010; Ruckinger *et al.*, 2010). Dass Stämme mit unterschiedlichen Serotypen verschiedene Transmigrationsraten aufweisen, wurde durch die vorangegangenen Experimente deutlich. Ein serotypspezifischer Effekt sollte bei den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden. Das Nationale Referenzzentrum für Streptokokken stellte für die Transmigrationsuntersuchungen über die HBMEC-BHS vier Isolate zur Verfügung. Drei Isolate wurden aus Meningitispatienten gewonnen und das vierte aus einem asymptomatischen Träger. Alle vier Isolate wiesen ähnliche Transmigrationsraten auf. Das Trägerisolat „SPN 282“ unterschied sich nicht von den Isolaten aus Meningitispatienten. Im Hinblick auf die Transmigrationshäufigkeit zeigte Serotyp 7F „SPN 289“ einen signifikant niedrigeren Wert als die übrigen Isolate. Dieses Isolat stammt aus dem gleichen Patienten wie „SPN 290“ mit dem Unterschied, dass „SPN 290“ aus der CSF und „SPN 289“ aus dem Blut isoliert wurde. Da es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um den gleichen Stamm handelt, sind die Unterschiede möglicherweise durch eine unterschiedliche Expression der Kapsel verursacht worden. Für Pneumokokken wurde das Phänomen der Phasenvariation beschrieben. Pneumokokken zeigen zwei verschiedene Koloniemorphologien, opaque und transparent. Dieses Erscheinungsbild beruht auf einer unterschiedlichen Kapselexpression und führt zu verschiedenen Kapselschichtdicken. Die Kapselvarianten stehen im Zusammenhang mit der Virulenz und können als Anpassung an verschiedene Nischen verstanden werden (Kim & Weiser, 1998; Weiser *et al.*, 1994; 1998). Pneumokokken mit transparentem Phänotyp haben eine dünnere Kapsel und kolonisieren erfolgreicher den Nasopharynx. Pneumokokken mit opakem Phänotyp haben eine dickere Kapsel, sind besser vor Phagozytose geschützt und damit besser an ein Überleben im Blutstrom angepasst. Klinische Isolate sind meist heterogen

bezüglich ihrer Kapselexpression. Opaque und transparente Phänotypen kommen gemischt vor (Cundell *et al.*, 1995b; Nelson *et al.*, 2007; Weiser *et al.*, 1994; Weiser, 2010).

„SPN 289“ hat als Blutisolat möglicherweise eine stärkere Kapselexpression und zeigt daher im *in vitro* Transwellsystem eine verringerte Transmigrationshäufigkeit. Um über die BHS zu transmigrieren, adhären die Pneumokokken an die zerebralen Endothelzellen, was mit einer dünneren Kapsel besser gelingt (Hammerschmidt *et al.*, 2005). Pneumokokken, die die BHS überwunden haben, sind möglicherweise weniger stark bekapselt. Sollten die Isolate ihren Kapselphänotyp beibehalten haben, würde sich dies in der Transmigrationshäufigkeit widerspiegeln, wie im Fall von „SPN 289“ und „290“. Stärker bekapselten Varianten gelingt die erfolgreiche Adhäsion seltener. Ist sie erfolgreich, unterscheiden sich die Varianten möglicherweise kaum noch im Hinblick auf die Transmigration. Dies ist in den ähnlichen Transmigrationsraten von „SPN 289“ und „290“ erkennbar.

Weitere Transmigrationsversuche wurden mit wildtypischen Pneumokokken und Kapselmutanten durchgeführt. Die bereits erwähnten Serotyp 7F Stämme wurden für Insertions-Deletions-Mutagenesen im Kapselgenlocus verwendet. Der Serotyp 7F Stamm „SPN 277“ wurde erfolgreich mutagenisiert und die Mutante ist kapseldefizient. Für vergleichende Untersuchungen wurden weiterhin Kapselmutanten von Serotyp 2 „SPN D39“ und Serotyp 4 „SPN TIGR4“ verwendet. Vom Stamm Serotyp 2 „SPN D39“ wurde auch die Doppelmutante für die Kapsel und das Pneumolysin in Transmigrationsversuchen über das optimierte ECV304-C6 BHS-Modell und das HBMEC BHS-Modell untersucht.

Die Transmigrationsversuche über die ECV304-C6 BHS zeigten, dass der Serotyp 2 Stamm „SPN D39“  $\Delta cps$  und Serotyp 7F „SPN 277“  $\Delta cps$  „CUEF“ im Gegensatz zu ihren wildtypischen Stämmen nicht transmigrierten. Untersuchungen im HBMEC BHS-Modell zeigten, dass bei „SPN 277“ die Kapseldeletion zu einer signifikanten Verringerung der Transmigrationshäufigkeit führte. Die Doppelmutante Serotyp 2 „SPN D39“  $\Delta cps \Delta ply$  transmigrierte über das ECV304-C6 BHS-Modell etwas stärker als der Wildtyp. Die höchste Transmigrationsrate zeigte der kapseldefiziente Serotyp 4 „SPN TIGR4“.

Vergleicht man die Ergebnisse der Transmigration über die beiden BHS-Modelle miteinander, fällt auf, dass die Serotyp 2 Stämme und Mutanten sich im HBMEC-Modellsystem entgegengesetzt verhalten. Während die Transmigration und die Transmigrationshäufigkeit bei der Kapselmutante ansteigen, sind sie bei der Doppelmutante deutlich verringert. Die Wirkung von Pneumolysin auf Gewebesbarrieren führt i.d.R. zu einer wesentlich erhöhten

Permeabilität (Rayner *et al.*, 1995; Zysk *et al.*, 2001). Zysk und Kollegen konnten zeigen, dass eine Pneumolysinmutante im Gegensatz zum Wildtyp des gleichen Serotyp 2 Stammes SPN D39 keinen Effekt auf die Integrität des BHS-Modells aus primären HBMECs hatte (Zysk *et al.*, 2001). Bezüglich der Transmigration würde man eine verringerte Transmigrationsrate der Pneumolysinmutante erwarten, wie für die Doppelmutante im HBMEC BHS-Modell gezeigt und nicht eine Erhöhung, wie im sie im ECV304-C6 Modell auftrat. Um den Effekt von Pneumolysin im Zusammenhang mit bestimmten Kapselserotypen zu untersuchen, wäre die Analyse der Pneumolysinmutante mit Kapsel von großem Interesse. Für eine korrekte Einordnung des Transmigrationsverhaltens von dem kapseldefizienten Serotyp 4 „SPN TIGR4“ wäre die Untersuchung der Transmigration des Wildtyps über die BHS notwendig.

Das Transmigrationsverhalten des Serotyps 7F „SPN 277“  $\Delta cps$  „CUEF“ ließ sich reproduzieren. Wie im ECV304-C6 BHS-Modell verringerte sich die Transmigrationshäufigkeit im Vergleich zum Wildtyp im HBMEC-Modell signifikant. Das Fehlen oder eine Reduktion der Kapsel könnte in diesem Fall die Adhärenz fördern (Hammerschmidt *et al.*, 2005), ist jedoch möglicherweise für den nachfolgenden Invasions- und Transmigrationsprozess hinderlich. Untersuchungen mit *E. coli* K1 haben gezeigt, dass die K1 Kapsel für das intrazelluläre Überleben in HBMECs essentiell ist und die Reifung des späten Endosoms zum Lysosom verhindert (Kim *et al.*, 2003). Ring und Kollegen stellten fest, dass die intrazelluläre Überlebensfähigkeit von Pneumokokken in HBMECs generell gering ist und nach 6 h nur noch 45 % der intrazellulären Bakterien lebensfähig waren. Sie konnten auch zeigen, dass transparente Formen besser transmigrieren als opaque Formen (Ring *et al.*, 1998). Dies deutet darauf hin, dass die Kapsel wichtig für das intrazelluläre Überleben ist. Im Gegensatz zur Kapseldicke sind Faktoren essentiell, die die Verschmelzung mit den Lysosomen verhindern und eine effektive Transzytose ermöglichen. Kleine GTPasen der Rab Familie sind am intrazellulären Vesikeltransport beteiligt und in Studien von Radin und Kollegen assoziierte die Hälfte der Pneumokokken-Endosomen zuerst mit Rab5 und Rab7 und verschmolz dann mit den Lysosomen. Die anderen 50 % kolokalisierten nicht mit Rab7 und translozierten (Radin *et al.*, 2005).

Die Fähigkeit der Pneumokokken die BHS lebend zu überwinden, beruht demnach darauf, den intrazellulären Vesikeltransport aktiv zu manipulieren. Dies erfordert die Interaktion von Oberflächenmolekülen mit der Endosomenmembran, wie beispielsweise die PAFr-Phosphorylcholinbindung (Cundell *et al.*, 1995a), die durch eine dickere Kapselschicht

vermutlich erschwert würde. Für Pneumokokken wurden bisher 91 verschiedene Serotypen charakterisiert und analysiert (Bentley *et al.*, 2006) und bestimmte Serotypen sind in bestimmten Patientengruppen mit einem höheren Risiko für invasive Erkrankungen assoziiert. Beispielsweise stand in einer Studie mit erkrankten Kindern unter 16 Jahren Serotyp 7F in Verbindung mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für eine ernsthafte Pneumokokken-erkrankung mit fatalem Ausgang (Ruckinger *et al.*, 2009b). Henriques-Normark und Kollegen kommen in ihren vergleichenden Analysen klinischer Studien allerdings zu dem Schluss, dass nicht nur die Kapsel einen wichtigen Beitrag zur serotypspezifischen Virulenz hat, sondern auch die Expression anderer Virulenzfaktoren (Henriques-Normark *et al.*, 2008). Beispielsweise wurde bei Pneumokokken ein weiterer Pilustyp entdeckt, der mit den verstärkt auftretenden Serotypen 1, 2, 7F, 19A und 19F assoziiert ist (Bagnoli *et al.*, 2008). Wie in den USA gezeigt werden konnte resultiert diese Serotypverschiebung aus der Einführung des 7-valenten Impfstoffes gegen Pneumokokken (Hicks *et al.*, 2007).

Die Analyse der Transmigration verschiedener Streptokokkenstämme über die BHS-Modelle ECV304-C6 und HBMEC in dieser Arbeit haben gezeigt, dass sich die klinische Charakterisierung der Isolate nicht auf das Transmigrationsverhalten im *in vitro* BHS-Modell übertragen lässt. In einigen Fällen lassen sich jedoch Tendenzen für eine Korrelation erkennen. Es konnte auch gezeigt werden, dass durch die Analyse der prozentualen Transmigrationshäufigkeit die Unterschiede zwischen verschiedenen Stämmen deutlicher hervortreten. Weiterhin ist es gelungen, von einem klinischen Isolat eine Kapselmutante zu erzeugen, deren Transmigrationsverhalten sich im Vergleich zum Wildtyp sowohl im ECV304-C6 BHS-Modell als auch im HBMEC BHS-Modell als konsistent erwiesen hat.

## **5.4 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK**

Die meisten Wirbeltiere verfügen über eine Blut-Hirnschranke (BHS). Sie schützen somit ihr zentrales Nervensystem vor ungewollten Einflüssen und sorgen für gleichbleibende Bedingungen, die für die optimale Funktion des ZNS erforderlich ist (Abbott, 2005). Abbott und Kollegen vermuten, dass die Vorteile, die in der Aufrechterhaltung der ionischen Homöostase liegen, die Entwicklung einer dichten BHS begünstigt haben. Diese Homöostase ist Voraussetzung für eine funktionierende Reizweiterleitung der Neuronen und Organismen, die hierzu fähig waren, hatten einen evolutionären Vorteil gegenüber anderen (Abbott *et al.*,

1986). Neben der Homöostase erfüllt die BHS weitere wichtige, bereits erwähnte Funktionen. Wie wichtig die Schutzfunktionen der BHS sind, zeigt sich an den Folgen von Infektionen des ZNS. Neben einer hohen Sterblichkeit leiden Überlebende oftmals unter diversen neurologischen Schäden.

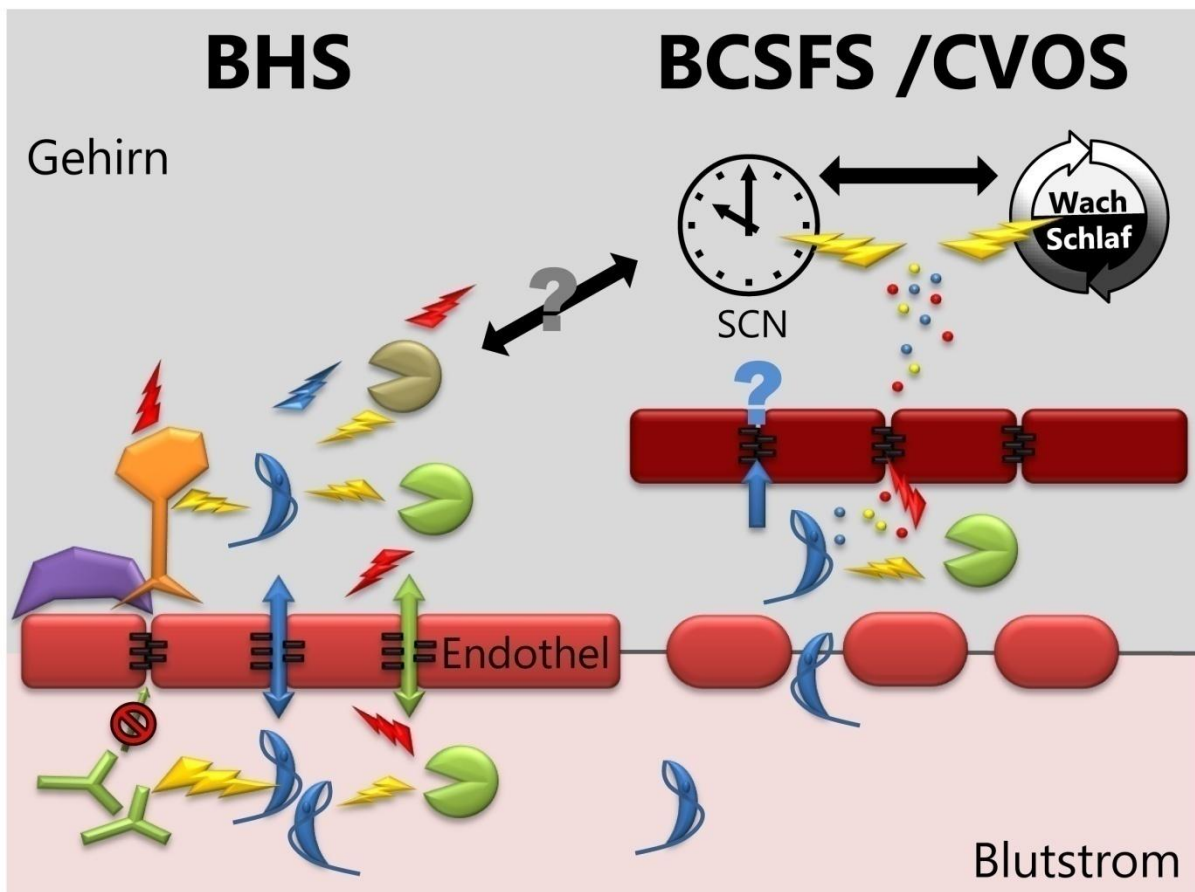
Streptokokken leben als Teil der Normalflora auf menschlichen Schleimhäuten und konkurrieren mit anderen opportunistischen Krankheitserregern und Kommensalen um diesen Lebensraum. Es herrscht ein Gleichgewicht zwischen dem Virulenzstatus des Keims und dem Immunstatus des Menschen. Wird dieses Gleichgewicht gestört, können Streptokokken insbesondere auch Pneumokokken invasive Erkrankungen auslösen. Im schlimmsten Fall überwinden sie die BHS und lösen eine Meningitis aus. Die Aufklärung der Pathomechanismen ist Gegenstand der aktuellen Forschung und BHS-Modellsysteme finden Anwendung in der Grundlagenforschung. In der Praxis bedeutet dies, dass *in vitro* BHS-Modelle, die im Labor etabliert werden, unter bestimmten Bedingungen und in einem bestimmten Zeitfenster verlässliche Aussagen erlauben. In Transmigrationsstudien müssen die jeweiligen Infektionsbedingungen an das BHS-Modellsystem angepasst werden. Es stellen sich Fragen nach der Höhe der Inokuli und nach der Länge der Infektionszeit. In dieser Arbeit wurden zwei BHS-Modellsysteme erfolgreich etabliert und in Infektionsstudien mit Trypanosomen und Streptokokken angewendet. Schließlich stellen sich Fragen nach der Art der Auswertung der Daten. In dieser Arbeit zeigte sich bei den Transmigrationsuntersuchungen, dass nicht nur die Menge der transmigrierten Streptokokken, sondern auch deren Transmigrationshäufigkeit eine Rolle spielt. In einem Transmigrationsversuch sind der Raum gegeben als die Füllhöhe des Mediums über der Fläche der BHS-Zellen und die Zeit gegeben als Infektionsdauer begrenzt, das bedeutet, dass die Transmigrationsprozesse nur mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit vollständig abgeschlossen werden. Variablen, die die Transmigrationswahrscheinlichkeit erhöhen oder erniedrigen, sind die Virulenzfaktoren, die ein Bakterium bei diesem Prozess einsetzen kann. Der Hauptvirulenzfaktor der Pneumokokken ist die Kapsel, allerdings hat sich in dieser Arbeit gezeigt, dass sie anscheinend nicht der einzige Faktor ist, um klinische Isolate im Transmigrationsversuch zu unterscheiden. Dies bedeutet für weitere Versuche, dass bestimmte Virulenzfaktoren vor einem bestimmten Serotyp-Hintergrund untersucht werden sollten. In dieser Arbeit wurden Bedingungen gefunden, unter denen ein klinisches Isolat mutagenisiert werden konnte. Diese Bedingungen gilt es weiter zu optimieren, um die Transformationseffizienz weiter zu erhöhen.



Bezüglich der Versuchsbedingungen könnte der Einfluss von Sauerstoff, CO<sub>2</sub> und von subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen als Stressinduktor auf die Transformationseffizienz ausgetestet werden. Die in dieser Arbeit erzeugte Mutante ist möglicherweise aufgrund der fehlenden Kapsel zugänglicher für weitere Insertions-Deletions-Mutagenesen. Auf diese Weise könnten weitere Virulenzfaktoren vor dem Serotyp 7F Hintergrund untersucht werden.

Als längerfristiges Ziel im Hinblick auf die Weiterentwicklung von BHS-Modellen wäre es denkbar, dass man ein verlässliches *in vitro* BHS-Modell in einem Referenzlabor für die funktionale Charakterisierung von Isolaten asymptomatischer Träger entwickelt und einsetzt. Zusammen mit genomischen Charakterisierungstests wie multi locus sequenz typing (MLST) könnte man das Gefährdungspotential eines Trägerisolats beurteilen und dem Träger zu einer präventiven Antibiotikabehandlung raten oder abraten. Dies könnte möglicherweise Sekundärinfektionen bei Grippewellen eindämmen.

Afrikanische Trypanosomen sind keine opportunistischen Krankheitserreger wie Streptokokken, sondern klassische Parasiten. Evolutionsbiologisch gesehen gelten solche Parasiten als besser an ihren Wirt angepasst, die ihren Wirt länger am Leben lassen, um die Chancen auf die Verbreitung durch den Vektor, wenn sie denn durch einen übertragen werden, zu erhöhen. Als Beispiel sei die weltweit in Rindern und anderen Nutztieren verbreitete Trypanosomenart *T. theileri* genannt, deren Infektion in den meisten Fällen asymptomatisch verläuft (Villa *et al.*, 2008). *T. b. gambiense* verursacht die chronisch verlaufende westafrikanische Schlafkrankheit, die sich unbehandelt in der Regel nach sechs Jahren tödlich auswirkt. Innerhalb dieser Zeit kann die Krankheit über die Tsetsefliege weiter verbreitet werden. Überwindet der Parasit die BHS, kommt es als Folge der Interaktion mit dem Immunsystem zu neurologischen Veränderungen, die zu Wesensveränderungen, zu Apathie, zur Störung des Wach-Schlafrhythmus und schließlich zu Koma und Tod führen. Es stellt sich die Frage, ob diese Veränderungen die Verbreitung fördert. Auch von anderen Parasiten ist bekannt, dass sie das Verhalten ihres Wirts verändern können und damit ihre Verbreitung fördern. Möglicherweise ist die Übertragung zwischen Vektor und apathischem Wirt öfter erfolgreich, als bei gesunden Menschen, die sich dem schmerzhaften Biss der Tsetsefliege erwehren (M. Steinert, persönliches Gespräch). Träfe dies zu, käme es bei Patienten im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit zu Mehrfachinfektionen, was Einfluss



**Abb. 5.1:** Schematische Darstellung der ZNS Infektion durch Trypanosomen

Zerebrales **Endothel** (hellrot) bildet die Blutgefäße im Gehirn. **Perizyten** und **Astrozyten** induzieren in den Kapillarendothelzellen die Ausbildung dichter „tight junctions“ (TJ; **schwarze Balken**), ein essentielles Merkmal der Blut-Hirnschranke (**BHS**; links). **Trypanosomen** vermehren sich im Blutstrom und können die BHS bidirektional überwinden, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. **Zellen des Immunsystems** wie Makrophagen und T-Zellen können die BHS ebenfalls überwinden. Bei dem Transmigrationsprozess wird die BHS nicht geschädigt. Hinter der BHS sind die Trypanosomen vor den Antikörpern (links unten) geschützt und können sich möglicherweise vermehren. Die Immunzellen setzen trypanotoxische Substanzen (**gelbe Blitze**) wie  $\text{TNF}\alpha$  oder NO-Radikale frei. Langfristig gelingt es den Trypanosomen jedoch, die Immunantwort herunter zu regulieren. Proinflammatorische Mediatoren (**rote Blitze**) werden freigesetzt und erhöhen die parazelluläre Permeabilität. Im ZNS reagieren aktivierte **Astrozyten** und **Mikroglia** auf die Trypanosomen und setzen ebenfalls proinflammatorische und trypanotoxische Agenzien frei. In den Bereichen des Plexus Choroideus (PC) und der zirkumventrikulären Organe (CVO) ist das Endothel fenestriert (zellfreie Bereiche, die von einer Glykokalyx überspannt sind) und spezialisierte Zellen wie PC-Epithelzellen oder Tanyzyten bilden dichte Barrieren mit TJs aus (Blut-Cerebrospinalflüssigkeits-Schranke/ CVO-Schranke; **BCSFS / CVOS**; rechts). Trypanosomen verlassen das Blutgefäßsystem in fenestrierten Bereichen noch bevor sie die BHS überwinden. Auch in diese Bereiche folgen ihnen Immunzellen. In enger Nachbarschaft des PC und der CVO liegen die Steuerungszentren der biologischen Uhr (**SCN**, suprachiasmatischer Nukleus) und des **Schlaf-Wachzyklus**. Proinflammatorische Mediatoren (**rote Blitze**) verringern vermutlich die Dichtigkeit der TJs und trypanosomale Faktoren (**blaue Kugeln**; z.B. Prostaglandin  $\text{D}_2$ ) und Faktoren des Immunsystems (**rote** und **gelbe Kugeln**) gelangen über die Barrieren und nehmen Einfluss auf den SCN und den Schlaf-Wachzyklus und es zeigen sich die typischen neurologischen Symptome der Afrikanischen Schlafkrankheit. Unklar ist bisher, ob Trypanosomen im ZNS aktiv zur Zellschädigung beitragen (**blauer Blitz**) oder ob sie auch über die Schranke der CVO und des PC gelangen. Weiterhin stellt sich die Frage, ob aktivierte Astrozyten und Mikroglia zu der neurologischen Pathogenese beitragen (Kristensson *et al.*, 2010; Untucht *et al.*, 2011).

auf die Populationsstruktur der Trypanosomen im Wirt hätte und sich über genetische Untersuchungen bestätigen ließe.

Zur Behandlung der afrikanischen Schlafkrankheit stehen nur wenige Medikamente zur Verfügung und die Art der Behandlung hängt von der Phase der Krankheit ab. In dieser Arbeit konnte erstmals *in vitro* gezeigt werden, dass Trypanosomen die BHS in beiden Richtungen überwinden können. Dies unterstützt die Hypothese, dass das ZNS als potentiell Reservoir für Trypanosomen fungieren kann (**Abb. 5.1**). Der nicht diagnostizierte ZNS-Befall mit Trypanosomen führt bei einer Behandlung mit Phase 1 Medikamenten, die die BHS nicht überwinden können zu einer hohen Rückfallquote. Erst wenn zwei Jahre lang nach der Behandlung keine Trypanosomen mehr im Blut nachweisbar sind, gilt ein Patient als geheilt (Lejon *et al.*, 2010). Andererseits ist es unverantwortbar Phase 2 Medikationen häufiger als unbedingt nötig einzusetzen. Im Fall von Melarsoprol sterben immerhin 5 % aller Behandelten. Weiterhin treten verstärkt Melarsoprolresistenzen auf (Brun *et al.*, 2001), so dass man dazu übergeht, immer mehr Patienten der komplizierten Eflornithinbehandlung zu unterziehen. Im Vergleich zu 2003 sank 2008 der prozentuale Anteil an Melarsoprolbehandlungen von 88 % auf 51 % ab (WHO, 2010). Eine weitere Therapieverbesserung ist möglicherweise die Eflornithin-Nifurtimox Kombinationsbehandlung (Kroubi *et al.*, 2011; Priotto *et al.*, 2006). Im Bereich der Therapieverbesserungen bieten sich *in vitro* BHS-Modelle an, um die Kombination von Medikamenten wie Minocyclin (Masocha *et al.*, 2006) oder Hydrocortison (PD Dr. A. Stich, Arzt für Tropenmedizin an der Missionsärztlichen Klinik in Würzburg; persönliches Gespräch), die sich auf den Entzündungsprozess oder die BHS Permeabilität auswirken können, zu untersuchen. Ein erster Schritt in diese Richtung war die Untersuchung der Brucipaininhibitoren auf die Transmigration von *T. b. gambiense* STIB930 in dieser Arbeit. Letztlich würde sich die Verwendung von *in vitro* BHS-Modellen als letzter Schritt vor Versuchen an Tieren in der Medikamentenentwicklung anbieten und auf diese Weise Versuchstiere einsparen helfen.

In den nächsten Jahren ist allerdings nicht mit neuen Medikamenten zu rechnen, da es für Schlafkrankheitsmedikamente keinen ausreichend attraktiven Absatzmarkt gibt. Daher zählt die WHO die Schlafkrankheit zu den „neglected tropical diseases“ und die Medikamentenentwicklung wird von privaten Stiftungen und staatlichen Institutionen gefördert. Daher ist es mittelfristig unbedingt notwendig, die Screening- und

Vektorkontrollprogramme fortzuführen, die seit Anfang 2000 zu einem kontinuierlichen Rückgang der Fallzahlen geführt haben (WHO, 2010).

*In vitro* BHS-Modelle sind artifizielle Gewebemodelle, die die Untersuchung komplexer Zell-Zellinteraktionsmechanismen erlauben. Hierzu gehören die Untersuchungen der Induktion der Barrierefunktionen als zellbiologische Fragestellung und die der Transmigration von Pathogenen als infektionsbiologisches Thema. Neben der Verwendung in der Grundlagenforschung sind *in vitro* BHS-Modelle auch für anwendungsorientierte Forschungsprojekte in der Medikamentenentwicklung oder für die Therapieoptimierung in der Medizin geeignet. Streptokokken und Trypanosomen sind potentiell tödliche ZNS Invasoren und die Aufklärung der Pathomechanismen, die dieser Invasion zu Grunde liegen sind spannende und wichtige Forschungsprojekte, die letztendlich zu verbesserten oder neuen Therapieansätzen führen werden.

## 6 ANHANG

### 6.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
BHS	Blut-Hirnschranke
BSA	Bovine serum albumin
CSF	Zerebrospinalflüssigkeit
CVO	zirkumventrikuläre Organe
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dH <sub>2</sub> O	einfach deionisiertes Wasser
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extrazelluläre Matrix
ECV304	"endothelial capillary vein" Zellen Nr. 304
FCS	fetale calf serum
GBS /GCS	Gruppe B /C Streptokokken
h	hour/-s (Stunde)
i.d.R.	in der Regel
(H)BMEC	(human) brain microvascular endothelial cells
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria Bertani
min	Minute/-n
MMP	Matrix-Metalloproteasen
PBS	1fach konzentriert, pH 7,4 (Phosphat buffered saline)
PFA	Paraformaldehyd
Q286	Quantum 286 Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde/-n
SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , Pneumokokken
t	time (Zeit)
Tab.	Tabelle
TEER	transendothelialer elektrischer Widerstand
TJ	tight junction (zonula occludens)
üN	über Nacht
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 6.2 ERGÄNZUNGEN

### 6.2.1 ROHDATEN WACHSTUMSVERSUCHE MIT TRYPANOSOMEN

**Tab. 6.1: *T. b. brucei* TC221 (Abb. 4.11, S. 110)**

Zeitpunkt [h]	Q286 + 10 % HoS		Q286 + 10 % FCS		Q286 ohne Serum		BC Medium	
	Werte	SA	Werte	SA	Werte	SA	Werte	SA
0	3,03E+05	5,92E+04	3,03E+05	5,92E+04	3,03E+05	5,92E+04	3,03E+05	5,92E+04
1	2,88E+05	8,43E+04	2,56E+05	5,18E+04	2,93E+05	7,41E+04	3,01E+05	6,37E+04
2	2,75E+05	5,58E+04	3,05E+05	5,47E+04	3,12E+05	6,13E+04	3,05E+05	5,74E+04
3	3,03E+05	5,58E+04	3,01E+05	4,62E+04	2,73E+05	6,72E+04	3,23E+05	6,62E+04
4	2,80E+05	7,15E+04	3,13E+05	7,99E+04	3,08E+05	6,56E+04	3,74E+05	7,89E+04
5	3,23E+05	9,55E+04	3,31E+05	7,42E+04	4,81E+05	4,11E+05	3,81E+05	1,04E+05
6	2,01E+05	5,99E+04	2,93E+05	7,63E+04	2,82E+05	5,51E+04	3,38E+05	8,60E+04
24	9,75E+04	3,19E+04	3,18E+05	5,25E+04	3,23E+05	5,45E+04	2,14E+06	5,27E+05
48	2,41E+04	1,62E+04	3,66E+05	5,81E+04	2,73E+05	1,43E+05	6,77E+06	1,44E+06

**BC**= Baltz Complete, **HoS**= Horse Serum, **SA**= Standardabweichung, **Q286**= Quantum 286

**Tab. 6.2: *T. b. gambiense* STIB930 (Abb. 4.12, S. 110)**

Zeitpunkt [h]	HuMEM Medium		Q286 ohne Serum		Q286 + 10 % FCS	
	Werte	SA	Werte	SA	Werte	SA
0	2,68E+05	4,75E+04	2,86E+05	8,83E+04	2,86E+05	8,83E+04
1	1,72E+05	4,39E+04	2,32E+05	5,16E+04	2,13E+05	4,12E+04
2	1,60E+05	5,34E+04	2,27E+05	4,20E+04	2,21E+05	4,76E+04
3	1,62E+05	3,82E+04	2,28E+05	6,12E+04	2,06E+05	5,48E+04
4	1,58E+05	4,45E+04	2,12E+05	5,11E+04	2,05E+05	4,40E+04
5	1,53E+05	4,77E+04	2,17E+05	5,46E+04	2,19E+05	5,18E+04
6	1,72E+05	4,53E+04	2,06E+05	5,79E+04	2,15E+05	3,37E+04
24	3,33E+05	6,66E+04	1,46E+05	3,55E+04	1,94E+05	6,43E+04
48	7,02E+05	9,45E+04	3,19E+04	2,08E+04	7,17E+04	2,25E+04

**SA**= Standardabweichung, **Q286**= Quantum 286

**Tab. 6.3: *T. b. brucei* TC221 + J774 MΦ (Abb. 4.16, S. 115)**

Zeitpunkt [h]	Tbb (+ J774)		J774 (+ Tbb)		Tbb		J774	
	Werte	SA	Werte	SA	Werte	SA	Werte	SA
0	2,00E+05	n.d.	5,00E+05	n.d.	2,00E+05	n.d.	5,00E+05	n.d.
24	1,70E+06	7,07E+04	1,38E+06	4,71E+04	1,17E+06	2,83E+05	1,17E+06	1,41E+05
48	9,25E+05	1,18E+04	1,19E+06	1,18E+05	4,18E+06	3,42E+05	1,37E+06	1,12E+05
72	4,28E+05	1,01E+05	1,79E+06	1,36E+05	1,53E+06	3,42E+05	1,98E+06	5,89E+03

**SA**= Standardabweichung, **n.d.**= not determined, **Tbb**= *T. b. brucei* TC221,

## 6.2.2 PROTOKOLL: RTP® DNA/RNA VIRUS MINI KIT (INVITEK)

Protocol 3 : Simultaneous isolation of total nucleic acids  
(DNA and RNA) from cell culture supernatants

Please read the protocols carefully prior to the start of the preparation procedure!

*Important Note: Prewarm the needed amount of Elution Buffer R to 80°C for the final elution step.*

### 1. Sample Lysis

Mix 200 µl of the cell culture supernatant (cell culture media) with 200 µl of ddH<sub>2</sub>O. Transfer the sample into the provided Extraction Tube. Close the cap and vortex shortly. Place the Extraction Tube into a thermomixer and incubate under continuously shaking for 15 min at 65°C and for 10 minutes at 95°C, which leads to higher sensitivity.

### 2. Binding of the DNA and RNA

Add 400 µl Binding Solution to the provided Extraction Tube and mix the sample completely by pipetting up and down or by vortexing. Transfer the sample into the Spin Filter Set. Close the cap and centrifuge for 1 minute at 9.300 x g (10.000 rpm). Discard the RTA Receiver Tube with filtrate and place the RTA Spin Filter into a new RTA Receiver Tube.

### 3. First Washing of the RTA Spin Filter

Add 500 µl Wash Buffer R1 to the RTA Spin Filter and centrifuge at 9.300 x g (10.000 rpm) for 30 sec. Discard the RTA Receiver Tube with filtrate and place the RTA Spin Filter into a new RTA Receiver Tube.

### 4. Second Washing of the RTA Spin Filter

Add 700 µl Wash Buffer R2 to the RTA Spin Filter and centrifuge at 9.300 x g (10.000 rpm) for 30 sec. Discard the RTA Receiver Tube with filtrate and place the RTA Spin Filter into a new RTA Receiver Tube. Remove the residual ethanol by final centrifugation for 4 min at maximum speed. Discard the RTA Receiver Tube with filtrate.

### 5. Elution of the DNA/ RNA

Place the RTA Spin Filter into a 1.5 ml Elution Tube. Add 60 µl of the Elution Buffer R (prewarmed to 80°C) directly onto the RTA Spin Filter surface. Incubate for 3 minutes at RT and centrifuge at 9.300 x g (10.000 rpm) for 1 minute.

### 6.2.3 PROTOKOLL: QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT

QIAquick Gel Extraction Kit Protocol  
using a microcentrifuge

This protocol is designed to extract and purify DNA of 70 bp to 10 kb from standard or low-melt agarose gels in TAE or TBE buffer. Up to 400 mg agarose can be processed per spin column. This kit can also be used for DNA cleanup from enzymatic reactions (see page 8). For DNA cleanup from enzymatic reactions using this protocol, add 3 volumes of Buffer QG and 1 volume of isopropanol to the reaction, mix, and proceed with step 6 of the protocol. Alternatively, use the MinElute Reaction Cleanup Kit.

#### Important points before starting

- The yellow color of Buffer QG indicates a pH  $\leq 7.5$ .
- Add ethanol (96–100%) to Buffer PE before use (see bottle label for volume).
- All centrifugation steps are carried out at 17,900 x g (13,000 rpm) in a conventional table-top microcentrifuge at room temperature.

#### Procedure

**1.** Excise the DNA fragment from the agarose gel with a clean, sharp scalpel.

Minimize the size of the gel slice by removing extra agarose.

**2.** Weigh the gel slice in a colorless tube. Add 3 volumes of Buffer QG to 1 volume of gel (100 mg ~ 100  $\mu$ l).

For example, add 300  $\mu$ l of Buffer QG to each 100 mg of gel. For >2% agarose gels, add 6 volumes of Buffer QG. The maximum amount of gel slice per QIAquick column is 400 mg; for gel slices >400 mg use more than one QIAquick column.

**3.** Incubate at 50°C for 10 min (or until the gel slice has completely dissolved). To help dissolve gel, mix by vortexing the tube every 2–3 min during the incubation.

IMPORTANT: Solubilize agarose completely. For >2% gels, increase incubation time.

**4.** After the gel slice has dissolved completely, check that the color of the mixture is yellow (similar to Buffer QG without dissolved agarose).

If the color of the mixture is orange or violet, add 10  $\mu$ l of 3 M sodium acetate, pH 5.0, and mix. The color of the mixture will turn to yellow. The adsorption of DNA to the QIAquick membrane is efficient only at pH  $\leq 7.5$ . Buffer QG contains a pH indicator which is yellow at pH  $\leq 7.5$  and orange or violet at higher pH, allowing easy determination of the optimal pH for DNA binding.

**5.** Add 1 gel volume of isopropanol to the sample and mix.

For example, if the agarose gel slice is 100 mg, add 100  $\mu$ l isopropanol. This step increases the yield of DNA fragments <500 bp and >4 kb. For DNA fragments between 500 bp and 4 kb, addition of isopropanol has no effect on yield. Do not centrifuge the sample at this stage.

**6.** Place a QIAquick spin column in a provided 2 ml collection tube.



- 7.** To bind DNA, apply the sample to the QIAquick column, and centrifuge for 1 min.  
The maximum volume of the column reservoir is 800 µl. For sample volumes of more than 800 µl, simply load and spin again.
- 8.** Discard flow-through and place QIAquick column back in the same collection tube.  
Collection tubes are reused to reduce plastic waste.
- 9.** Recommended: Add 0.5 ml of Buffer QG to QIAquick column and centrifuge for 1 min.  
This step will remove all traces of agarose. It is only required when the DNA will subsequently be used for direct sequencing, in vitro transcription, or microinjection.
- 10.** To wash, add 0.75 ml of Buffer PE to QIAquick column and centrifuge for 1 min.  
Note: If the DNA will be used for salt-sensitive applications, such as blunt-end ligation and direct sequencing, let the column stand 2–5 min after addition of Buffer PE, before centrifuging.
- 11.** Discard the flow-through and centrifuge the QIAquick column for an additional 1 min at 17,900 x g (13,000 rpm).  
IMPORTANT: Residual ethanol from Buffer PE will not be completely removed unless the flow-through is discarded before this additional centrifugation.
- 12.** Place QIAquick column into a clean 1.5 ml microcentrifuge tube.
- 13.** To elute DNA, add 50 µl of Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) or water (pH 7.0–8.5) to the center of the QIAquick membrane and centrifuge the column for 1 min. Alternatively, for increased DNA concentration, add 30 µl elution buffer to the center of the QIAquick membrane, let the column stand for 1 min, and then centrifuge for 1 min.  
IMPORTANT: Ensure that the elution buffer is dispensed directly onto the QIAquick membrane for complete elution of bound DNA. The average eluate volume is 48 µl from 50 µl elution buffer volume, and 28 µl from 30 µl.  
Elution efficiency is dependent on pH. The maximum elution efficiency is achieved between pH 7.0 and 8.5. When using water, make sure that the pH value is within this range, and store DNA at –20°C as DNA may degrade in the absence of a buffering agent. The purified DNA can also be eluted in TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0), but the EDTA may inhibit subsequent enzymatic reactions.
- 14.** If the purified DNA is to be analyzed on a gel, add 1 volume of Loading Dye to 5 volumes of purified DNA. Mix the solution by pipetting up and down before loading the gel.  
Loading dye contains 3 marker dyes (bromophenol blue, xylene cyanol, and orange G) that facilitate estimation of DNA migration distance and optimization of agarose gel run time. Refer to Table 2 (page 15) to identify the dyes according to migration distance and agarose gel percentage and type.

## 6.3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abb. 2.1:</b> Negativdarstellung des ZNS.....	4
<b>Abb. 2.2:</b> Barrieren im ZNS .....	4
<b>Abb. 2.3:</b> Zellen der Blut-Hirnschranke.....	6
<b>Abb. 2.4:</b> BHS Zell-Zellverbindungen .....	7
<b>Abb. 2.5:</b> Transportwege über die BHS.....	8
<b>Abb. 2.6:</b> ZNS-Schädigung durch Wirtsfaktoren.....	10
<b>Abb. 2.7:</b> <i>T. brucei brucei</i> .....	13
<b>Abb. 2.8:</b> Nagana bei Nutztieren.....	15
<b>Abb. 2.9:</b> Lebenszyklus von <i>T. cruzi</i> .....	16
<b>Abb. 2.10:</b> Kollage „Schlafkrankheits-bekämpfung durch deutsche Kolonialärzte“ .....	18
<b>Abb. 2.11:</b> Fallzahlen registrierter Afrikanischer Schlafkrankheit für 2008. ....	19
<b>Abb. 2.12:</b> Trypanosomenschanker.....	21
<b>Abb. 2.13:</b> Lebenszyklus von <i>T. brucei</i> ssp.....	24
<b>Abb. 2.14:</b> Schematische Darstellung eines Trypanosoms. ....	25
<b>Abb. 2.15:</b> VSG Mantel von Trypanosomen.....	26
<b>Abb. 2.16:</b> Trypanolytischer Faktor (TLF).....	27
<b>Abb. 2.17:</b> SPN Virulenzfaktoren bei der Kolonisierung des Respirationstrakts.....	37
<b>Abb. 2.18:</b> Adhärenzinduzierte Kapselreduktion .....	38
<b>Abb. 2.19:</b> Wege über die Blut-Hirnschranke .....	40
<b>Abb. 3.1:</b> Zellzahlberechnung in einer Zählkammer.....	62
<b>Abb. 3.2:</b> Doppel-DIF Färbung .....	64
<b>Abb. 3.3:</b> Schematische Darstellung des Kapsellokus und der Kanamycinkassette.....	70
<b>Abb. 3.4:</b> Berechnung der Hybridisierungstemperatur (Roche Kit) .....	78
<b>Abb. 3.5:</b> Schema zum Erstellen der optimierten ECV304-C6 BHS.....	82
<b>Abb. 3.6:</b> Der elektroosmotischer Fluss der Kapillarelektrophorese .....	89
<b>Abb. 4.1:</b> Inokuli-abhängige Transmigration von <i>E. coli</i> HB101 und K1.....	97
<b>Abb. 4.2:</b> Zeitabhängige Transmigration von <i>E. coli</i> HB101 und K1 .....	98
<b>Abb. 4.3:</b> REM Aufnahmen des optimierten ECV304-C6 BHS-Modells .....	99
<b>Abb. 4.4:</b> Abnahme der Arzneimittelkonzentration unter Inkubationsbedingungen .....	101
<b>Abb. 4.5:</b> Vergleich der log BB Werte der ECV304-C6 BHS mit Literaturwerten.....	101
<b>Abb. 4.6:</b> Evaluierung verschiedener HBMEC BHS-Modelle anhand der Permeabilität für <i>E. coli</i> HB101 .....	104
<b>Abb. 4.7:</b> DIF Fotografie infizierter HBMEC mit SPN 37.....	105
<b>Abb. 4.8:</b> DIF Fotografie infizierter HBMEC mit SPN 37.....	106

<b>Abb. 4.9:</b> Gelfotografie einer Mykoplasmen PCR .....	107
<b>Abb. 4.10:</b> Nachweis des Lamininrezeptors .....	108
<b>Abb. 4.11:</b> Wachstum von <i>T. b. brucei</i> TC221 in verschiedenen Medien .....	110
<b>Abb. 4.12:</b> Wachstum von <i>T. b. gambiense</i> STIB930 in verschiedenen Medien .....	110
<b>Abb. 4.13:</b> Transmigration afrikanischer Trypanosomen über das ECV304-C6 BHS-Modell .....	111
<b>Abb. 4.14:</b> Transmigration afrikanischer Trypanosomen über das inverse ECV304-C6 BHS-Modell ....	112
<b>Abb. 4.15:</b> REM-Darstellung von Trypanosomen in Transwelleinsätzen .....	113
<b>Abb. 4.16:</b> Wachstumsverlauf von Ko- und Einzelkultur von <i>T. b. brucei</i> TC221 und J774-Makrophagen .....	115
<b>Abb. 4.17:</b> Transmigration von J774-Makrophagen .....	116
<b>Abb. 4.18:</b> (Ko-)Transmigration von J774-Makrophagen und TC221-Trypanosomen .....	117
<b>Abb. 4.19:</b> Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die trypanosomale Transmigration .....	119
<b>Abb. 4.20:</b> Amplifikation und Aufreinigung der Kan-Kassette .....	121
<b>Abb. 4.21:</b> Wachstum der Stämme Serotyp 7F „SPN 277“ und „SPN 277“ $\Delta cps$ „CUEF“ mit und ohne Kanamycin .....	122
<b>Abb. 4.22:</b> Amplifikation der Kan-Kassette .....	122
<b>Abb. 4.23:</b> Nachweis der Kanamycinresistenzgenkassette im Southernblot .....	123
<b>Abb. 4.24:</b> Transmigration von <i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i> über die ECV304-C6 BHS .....	124
<b>Abb. 4.25:</b> Transmigration verschiedener <i>S. agalactiae</i> Isolate über die ECV304-C6 BHS .....	126
<b>Abb. 4.26:</b> Transmissionshäufigkeit verschiedener <i>S. agalactiae</i> Isolate über die ECV304-C6 BHS	127
<b>Abb. 4.27:</b> Transmigration von „Laborstämmen“ und klinischen Pneumokokkenisolaten .....	129
<b>Abb. 4.28:</b> Transmissionshäufigkeit von SPN Laborstämmen und klinischen Isolaten .....	130
<b>Abb. 4.29:</b> Zeitabhängige Transmigration zweier Pneumokokkenisolate über die ECV304-C6 BHS ....	130
<b>Abb. 4.30:</b> Zeitabhängige Transmissionshäufigkeit von zwei Pneumokokkenisolaten .....	131
<b>Abb. 4.31:</b> Transmigration von Kapselmutanten über die ECV304-C6 BHS .....	132
<b>Abb. 4.32:</b> Transmissionshäufigkeiten verschiedener Kapselmutanten über die ECV304-C6 BHS ....	133
<b>Abb. 4.33:</b> Transmigration von Pneumokokkenstämmen über die HBMEC BHS .....	134
<b>Abb. 4.34:</b> Transmissionshäufigkeit von Pneumokokkenstämmen über die HBMEC BHS .....	135
<b>Abb. 5.1:</b> Schematische Darstellung der ZNS Infektion durch Trypanosomen .....	168

## 6.4 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2.1: Relevante parasitierende Trypanosomenarten .....	14
Tab. 2.2: Unterschiede zwischen west- und ostafrikanischer Schlafkrankheit .....	22
Tab. 2.3: Lancefield Klassifikation von Streptokokken .....	29
Tab. 2.4: Pneumokokkenenerkrankungen von Kindern unter 5 Jahren .....	34

Tab. 3.1: Alphabetische Geräteliste .....	44
Tab. 3.2: Besondere Verbrauchsmaterialien .....	46
Tab. 3.3: Bakterienstämme .....	46
Tab. 3.4: Trypansomenstämme .....	48
Tab. 3.5: Eukaryontische Zelllinien .....	49
Tab. 3.6: Medium für die Kryokonservierung von Bakterien .....	49
Tab. 3.7: LB-Agar .....	50
Tab. 3.8: PBS (10fach) .....	50
Tab. 3.9: Umrechnung <i>E. coli</i> OD <sub>550 nm</sub> in Zellzahl/ mL .....	51
Tab. 3.10: THY-Medium und -Agar .....	52
Tab. 3.11: Verwendete Antibiotika .....	52
Tab. 3.12: Baltz-Medium Basic Solution .....	53
Tab. 3.13: Übersicht über verwendete Seren .....	54
Tab. 3.14: Baltz Complete (BMEM) .....	54
Tab. 3.15: $\beta$ -Mercaptoethanol-Lösung (0,14 %ig) .....	54
Tab. 3.16: BMEM für <i>T. b. rhodesiense</i> STIB900 .....	55
Tab. 3.17: HoMEM für <i>T. b. rhodesiense</i> STIB900 .....	55
Tab. 3.18: Hirumi spezial, Stammlösung 100fach .....	56
Tab. 3.19: HuMEM für <i>T. b. gambiense</i> STIB930 .....	56
Tab. 3.20: Kryomedium für Trypanosomen .....	58
Tab. 3.21: Zellkulturmedien und Medienzusätze .....	59
Tab. 3.22: Kryomedium für eukaryontische Zelllinien .....	60
Tab. 3.23: Probenfixierungspuffer für die Elektronenmikroskopie .....	65
Tab. 3.24: Pipettierschema für die Mykoplasmen PCR .....	67
Tab. 3.25: Primersequenzen für die Mykoplasmen PCR .....	67
Tab. 3.26: PCR-Reaktionszyklus für den Mykoplasmennachweis .....	67
Tab. 3.27: TAE-Laufpuffer für die Agarosegelelektrophorese (50fach) .....	68
Tab. 3.28: Ladepuffer für die Agarosegelelektrophorese .....	68
Tab. 3.29: Ansatz des Trypanosomen-Wachstumsversuchs .....	69
Tab. 3.30: Ansatz der Kokultur von Trypanosomen und Makrophagen .....	70
Tab. 3.31: Reagenzien für die DNA-Isolierung .....	71
Tab. 3.32: Lysepuffer .....	71
Tab. 3.33: CTAB-Lösung .....	72
Tab. 3.34: TRIS-Puffer (10 mM, pH 8) .....	72
Tab. 3.35: Primersequenzen für die Kapselmutagenese /-detektion .....	73

Tab. 3.36: PCR-Reaktionszyklus für die Kapselmutagenese .....	74
Tab. 3.37: PCR-Reaktionszyklus für DIG-Sondenherstellung .....	76
Tab. 3.38: Pipettierschema für die DIG-Sonden PCR.....	76
Tab. 3.39: 20fach SSC-Puffer .....	77
Tab. 3.40: Lösungen für die Southern Blot Detektion.....	80
Tab. 3.41: Arzneistoffe für Permeabilitätsstudien .....	87
Tab. 3.42: Verwendete Proteaseinhibitoren im Transwellversuch.....	90
Tab. 3.43: Strukturformeln der Proteaseinhibitoren .....	90
Tab. 3.44: Reagenzien für die SDS-PAGE .....	92
Tab. 3.45: Zusammensetzung 12 %iger SDS-Gele .....	92
Tab. 3.46: SDS-Probenpuffer, 4fach .....	92
Tab. 3.47: Lösungen für den Westernblot .....	93
Tab. 3.48: Lösungen für die Coomassie-Färbung.....	94
Tab. 3.49: Verwendete Antikörper .....	95
Tab. 4.1: Berechnete Log BB Werte im Vergleich mit Literaturwerten .....	102
Tab. 6.1: <i>T. b. brucei</i> TC221 (Abb. 4.11, S. 108).....	172
Tab. 6.2: <i>T. b. gambiense</i> STIB930 (Abb. 4.12, S. 108).....	172
Tab. 6.3: <i>T. b. brucei</i> TC221 + J774 MΦ (Abb. 4.16, S. 113).....	172

## 6.5 LITERATURVERZEICHNIS

**Abbott, N. J., Bundgaard, M. & Cserr, H. F. (1986).** Comparative physiology of the blood–brain barrier. In *The Blood–Brain Barrier in Health and Disease*, pp. 52–72. Edited by A. J. Suckling, M. G. Rumsby & M. W. Bradbury. Chichester, UK: Ellis Horwood.

**Abbott, N. J. (2005).** Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell Mol Neurobiol* **25**, 5–23.

**Abbott, N. J., Ronnback, L. & Hansson, E. (2006).** Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* **7**, 41–53.

**Agarwal, V., Asmat, T. M., Luo, S., Jensch, I., Zipfel, P. F. & Hammerschmidt, S. (2010).** Complement regulator Factor H mediates a two-step uptake of *Streptococcus pneumoniae* by human cells. *J Biol Chem* **285**, 23486–23495.

**Allt, G. & Lawrenson, J. G. (2001).** Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs* **169**, 1–11.

**Anderton, J. M., Rajam, G., Romero-Steiner, S., Summer, S., Kowalczyk, A. P., Carlone, G. M., Sampson, J. S. & Ades, E. W. (2007).** E-cadherin is a receptor for the common protein pneumococcal surface adhesin A (PsaA) of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog* **42**, 225–236.

**Andrade, L. O. & Andrews, N. W. (2005).** The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol* **3**, 819–823.

**Atkins, P. (1742).** The Navy Surgeon, or Praktical System of Surgery with a Dissertation on Cold and Hot Mineral Springs and Physical Observations on the Coast of Guinea. *J Hodges*.

**Austrian, R. (1981).** Some observations on the pneumococcus and on the current status of pneumococcal disease and its prevention. *Rev Infect Dis* **3 Suppl**, S1–17.

**Avery, O. T., Macleod, C. M. & McCarty, M. (1944).** Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from *Pneumococcus* Type Iii. *The Journal of experimental medicine* **79**, 137–158.

**Badger, J. L., Stins, M. F. & Kim, K. S. (1999).** *Citrobacter freundii* invades and replicates in human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* **67**, 4208–4215.

**Bagley, R. G., Weber, W., Rouleau, C. & Teicher, B. A. (2005).** Pericytes and endothelial precursor cells: cellular interactions and contributions to malignancy. *Cancer Res* **65**, 9741–9750.

**Bagnoli, F., Moschioni, M., Donati, C. & other authors (2008).** A second pilus type in *Streptococcus pneumoniae* is prevalent in emerging serotypes and mediates adhesion to host cells. *J Bacteriol* **190**, 5480–5492.

**Bakalara, N., Santarelli, X., Davis, C. & Baltz, T. (2000).** Purification, cloning, and characterization of an acidic ectoprotein phosphatase differentially expressed in the infectious bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* **275**, 8863–8871.

- Banerjee, A., Van Sorge, N. M., Sheen, T. R., Uchiyama, S., Mitchell, T. J. & Doran, K. S. (2010).** Activation of brain endothelium by pneumococcal neuraminidase NanA promotes bacterial internalization. *Cell Microbiol* **12**, 1576-1588.
- Barrett, M. P., Burchmore, R. J., Stich, A., Lazzari, J. O., Frasch, A. C., Cazzulo, J. J. & Krishna, S. (2003).** The trypanosomiasis. *Lancet* **362**, 1469-1480.
- Becton&Dickinson (2011).** BD Matrigel matrix. In *BD Extracellular Matrix Proteins*.
- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L. & Sweet, W. (1968).** Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* **161**, 370-371.
- Benninghoff, A. & Drenckhahn, D. (2004).** *Anatomie Band 2*. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- Bentley, S. D., Aanensen, D. M., Mavroidi, A. & other authors (2006).** Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet* **2**, e31.
- Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G. S. & Hammerschmidt, S. (2001).** alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol* **40**, 1273-1287.
- Bergmann, S., Wild, D., Diekmann, O., Frank, R., Bracht, D., Chhatwal, G. S. & Hammerschmidt, S. (2003).** Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed alpha-enolase of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **49**, 411-423.
- Bergmann, S., Rohde, M. & Hammerschmidt, S. (2004).** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasminogen-binding protein. *Infect Immun* **72**, 2416-2419.
- Bergmann, S. & Hammerschmidt, S. (2006).** Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology* **152**, 295-303.
- Bergmann, S., Lang, A., Rohde, M., Agarwal, V., Rennemeier, C., Grashoff, C., Preissner, K. T. & Hammerschmidt, S. (2009).** Integrin-linked kinase is required for vitronectin-mediated internalization of *Streptococcus pneumoniae* by host cells. *J Cell Sci* **122**, 256-267.
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C. & other authors (2005).** The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* **309**, 416-422.
- Bessen, D. E. (2009).** Population biology of the human restricted pathogen, *Streptococcus pyogenes*. *Infect Genet Evol* **9**, 581-593.
- Bogaert, D., De Groot, R. & Hermans, P. W. (2004).** *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* **4**, 144-154.
- Boveri, M., Berezowski, V., Price, A. & other authors (2005).** Induction of blood-brain barrier properties in cultured brain capillary endothelial cells: comparison between primary glial cells and C6 cell line. *Glia* **51**, 187-198.
- Boyer, H. W. & Roulland-Dussoix, D. (1969).** A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **41**, 459-472.

**Brandis, H., Eggers, H. J., Köhler, W. & Pulverer, G. (1994).** *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*, 7. Auflage edn. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

**Braun, A., Xu, H., Hu, F. & other authors (2007).** Paucity of pericytes in germinal matrix vasculature of premature infants. *J Neurosci* **27**, 12012-12024.

**Bringaud, F., Riviere, L. & Coustou, V. (2006).** Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol* **149**, 1-9.

**Bruce, D. (1895).** Preliminary Report of the Tsetse Fly Disease or Nagana in Zultland. *Bennet & Davis*.

**Brun, R., Schumacher, R., Schmid, C., Kunz, C. & Burri, C. (2001).** The phenomenon of treatment failures in Human African Trypanosomiasis. *Trop Med Int Health* **6**, 906-914.

**Brun, R. & Balmer, O. (2006).** New developments in human African trypanosomiasis. *Curr Opin Infect Dis* **19**, 415-420.

**Burns, A. R., Walker, D. C., Brown, E. S., Thurmon, L. T., Bowden, R. A., Keese, C. R., Simon, S. I., Entman, M. L. & Smith, C. W. (1997).** Neutrophil transendothelial migration is independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular corners. *J Immunol* **159**, 2893-2903.

**Burns, A. R., Bowden, R. A., MacDonell, S. D., Walker, D. C., Odebunmi, T. O., Donnachie, E. M., Simon, S. I., Entman, M. L. & Smith, C. W. (2000).** Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration. *J Cell Sci* **113** ( Pt 1), 45-57.

**Butt, A. M., Jones, H. C. & Abbott, N. J. (1990).** Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J Physiol* **429**, 47-62.

**Cardoso, F. L., Brites, D. & Brito, M. A. (2010).** Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Rev* **64**, 328-363.

**Chappuis, F., Loutan, L., Simarro, P., Lejon, V. & Buscher, P. (2005).** Options for field diagnosis of human african trypanosomiasis. *Clin Microbiol Rev* **18**, 133-146.

**Chen, S. H., Stins, M. F., Huang, S. H., Chen, Y. H., Kwon-Chung, K. J., Chang, Y., Kim, K. S., Suzuki, K. & Jong, A. Y. (2003).** Cryptococcus neoformans induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol* **52**, 961-970.

**Chung, J. W., Hong, S. J., Kim, K. J., Goti, D., Stins, M. F., Shin, S., Dawson, V. L., Dawson, T. M. & Kim, K. S. (2003).** 37-kDa laminin receptor precursor modulates cytotoxic necrotizing factor 1-mediated RhoA activation and bacterial uptake. *J Biol Chem* **278**, 16857-16862.

**Claverys, J. P., Prudhomme, M. & Martin, B. (2006).** Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **60**, 451-475.

**Claverys, J. P. & Havarstein, L. S. (2007).** Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'etre. *Nature reviews Microbiology* **5**, 219-229.

**Cserr, H. F., Fenstermacher, J. D. & Rall, D. P. (1978).** Comparative aspects of brain barrier systems for nonelectrolytes. *Am J Physiol* **234**, R52-60.



- Cucullo, L., Hossain, M., Rapp, E., Manders, T., Marchi, N. & Janigro, D. (2007).** Development of a humanized in vitro blood-brain barrier model to screen for brain penetration of antiepileptic drugs. *Epilepsia* **48**, 505-516.
- Cundell, D. R., Gerard, N. P., Gerard, C., Idanpaan-Heikkila, I. & Tuomanen, E. I. (1995a).** Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* **377**, 435-438.
- Cundell, D. R., Weiser, J. N., Shen, J., Young, A. & Tuomanen, E. I. (1995b).** Relationship between colonial morphology and adherence of Streptococcus pneumoniae. *Infect Immun* **63**, 757-761.
- Da Gama, L. M., Ribeiro-Gomes, F. L., Guimaraes, U., Jr. & Arnholdt, A. C. (2004).** Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion molecules and in vivo migration of murine macrophages infected with Toxoplasma gondii. *Microbes Infect* **6**, 1287-1296.
- Dagenais, T. R., Freeman, B. E., Demick, K. P., Paulnock, D. M. & Mansfield, J. M. (2009).** Processing and Presentation of Variant Surface Glycoprotein Molecules to T Cells in African Trypanosomiasis. *The Journal of Immunology* **183**, 3344-3355.
- Daulouede, S., Bouteille, B., Moynet, D., De Baetselier, P., Courtois, P., Lemesre, J. L., Buguet, A., Cespuglio, R. & Vincendeau, P. (2001).** Human macrophage tumor necrosis factor (TNF)-alpha production induced by Trypanosoma brucei gambiense and the role of TNF-alpha in parasite control. *J Infect Dis* **183**, 988-991.
- Dawid, S., Roche, A. M. & Weiser, J. N. (2007).** The blp bacteriocins of Streptococcus pneumoniae mediate intraspecies competition both in vitro and in vivo. *Infect Immun* **75**, 443-451.
- De Greef, C. & Hamers, R. (1994).** The serum resistance-associated (SRA) gene of Trypanosoma brucei rhodesiense encodes a variant surface glycoprotein-like protein. *Mol Biochem Parasitol* **68**, 277-284.
- de Lange, E. C., Danhof, M., de Boer, A. G. & Breimer, D. D. (1994).** Critical factors of intracerebral microdialysis as a technique to determine the pharmacokinetics of drugs in rat brain. *Brain Res* **666**, 1-8.
- Dehouck, M. P., Meresse, S., Delorme, P., Fruchart, J. C. & Cecchelli, R. (1990).** An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem* **54**, 1798-1801.
- Deli, M. A., Abraham, C. S., Kataoka, Y. & Niwa, M. (2005).** Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol* **25**, 59-127.
- Despommier, D., Gwadz, Hotez & Knirsch (2005).** *Parasitic Diseases*, 5. edn. New York: Apple Trees Productions L.L.C.
- Dirks, W. G., MacLeod, R. A. & Drexler, H. G. (1999).** ECV304 (endothelial) is really T24 (bladder carcinoma): cell line cross- contamination at source. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **35**, 558-559.
- Dohgu, S., Takata, F., Yamauchi, A. & other authors (2005).** Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production. *Brain Res* **1038**, 208-215.

**Dolman, D. E. M., Anderson, P., Rollinson, C. & Abbott, N. J. (1997).** Characterisation of a new in vitro model of the blood–brain barrier. *J Physiol* **505.P**, 56–57.

**Doran, K. S., Liu, G. Y. & Nizet, V. (2003).** Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contributes to development of meningitis. *J Clin Invest* **112**, 736–744.

**Duane, P. G., Rubins, J. B., Weisel, H. R. & Janoff, E. N. (1993).** Identification of hydrogen peroxide as a *Streptococcus pneumoniae* toxin for rat alveolar epithelial cells. *Infect Immun* **61**, 4392–4397.

**Dumas, M. & Bouteille, B. (2000).** Treatment of human African trypanosomiasis. *Bull World Health Organ* **78**, 1474.

**Dutton, J. E. (1902).** Preliminary note on the trypanosomes occurring in the blood of man. *Br Med J* **2**, 881.

**Easton, A. S. & Abbott, N. J. (2002).** Bradykinin increases permeability by calcium and 5-lipoxygenase in the ECV304/C6 cell culture model of the blood-brain barrier. *Brain Res* **953**, 157–169.

**ECDC (2010).** Annual epidemiological report on communicable diseases. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control.

**Eckert, J., Friedhoff, K. T., Zahner, H. & Deplazes, P. (2008).** *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*. Stuttgart: Enke Verlag.

**Ehrlich, P. (1885).** Das Sauerstoff-Bedürfnis des Organismus: Eine Farbenanalytische Studie. **8**, 167++.

**Elm, C., Braathen, R., Bergmann, S., Frank, R., Vaerman, J. P., Kaetzel, C. S., Chhatwal, G. S., Johansen, F. E. & Hammerschmidt, S. (2004).** Ectodomains 3 and 4 of human polymeric Immunoglobulin receptor (hPIgR) mediate invasion of *Streptococcus pneumoniae* into the epithelium. *J Biol Chem* **279**, 6296–6304.

**Engstler, M., Pfohl, T., Herminghaus, S., Boshart, M., Wiegertjes, G., Heddergott, N. & Overath, P. (2007).** Hydrodynamic flow-mediated protein sorting on the cell surface of trypanosomes. *Cell* **131**, 505–515.

**Enserink, M. (2007).** Entomology. Welcome to Ethiopia's fly factory. *Science* **317**, 310–313.

**Eyre, D. W., Kenkre, J. S., Bowler, I. C. & McBride, S. J. (2010).** *Streptococcus equi* subspecies zooepidemicus meningitis--a case report and review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **29**, 1459–1463.

**Facklam, R. (2002).** What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical microbiology reviews* **15**, 613–630.

**Feldman, C., Mitchell, T. J., Andrew, P. W., Boulnois, G. J., Read, R. C., Todd, H. C., Cole, P. J. & Wilson, R. (1990).** The effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin on human respiratory epithelium in vitro. *Microb Pathog* **9**, 275–284.

**Feldman, C., Cockeran, R., Jedrzejewski, M. J., Mitchell, T. J. & Anderson, R. (2007).** Hyaluronidase augments pneumolysin-mediated injury to human ciliated epithelium. *Int J Infect Dis* **11**, 11–15.

- Gaillard, P. J., de Boer, A. B. & Breimer, D. D. (2003).** Pharmacological investigations on lipopolysaccharide-induced permeability changes in the blood-brain barrier in vitro. *Microvasc Res* **65**, 24-31.
- Garrity, G. B., JA; Lilburn TG (2004).** *Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn. New York Berlin Heidelberg: Springer.
- Ghaffar, F., Friedland, I. R. & McCracken, G. H., Jr. (1999).** Dynamics of nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *The Pediatric infectious disease journal* **18**, 638-646.
- Gibson, W. & Bailey, M. (1994).** Genetic exchange in *Trypanosoma brucei*: evidence for meiosis from analysis of a cross between drug-resistant transformants. *Mol Biochem Parasitol* **64**, 241-252.
- Gibson, W., Peacock, L., Ferris, V., Williams, K. & Bailey, M. (2008).** The use of yellow fluorescent hybrids to indicate mating in *Trypanosoma brucei*. *Parasit Vectors* **1**, 4.
- Giri, R., Shen, Y., Stins, M., Du Yan, S., Schmidt, A. M., Stern, D., Kim, K. S., Zlokovic, B. & Kalra, V. K. (2000).** beta-amyloid-induced migration of monocytes across human brain endothelial cells involves RAGE and PECAM-1. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**, C1772-1781.
- Goldmann, E. (1913).** Vitalfärbung am Zentralnervensystem. Beitrag zur Physio-Pathologie des Plexus chorioideus und der Hirnhäute. *Abh Königl Preuss Akad Wiss Berlin* **1**, 1-61.
- Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P. & Jaramillo, B. E. (2003).** Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* **81**, 1-44.
- Grab, D. J., Nikolskaia, O., Kim, Y. V. & other authors (2004).** African trypanosome interactions with an in vitro model of the human blood-brain barrier. *J Parasitol* **90**, 970-979.
- Grab, D. J., Perides, G., Dumler, J. S. & other authors (2005).** *Borrelia burgdorferi*, host-derived proteases, and the blood-brain barrier. *Infect Immun* **73**, 1014-1022.
- Grab, D. J. & Kennedy, P. G. (2008).** Traversal of human and animal trypanosomes across the blood-brain barrier. *J Neurovirol* **14**, 344-351.
- Grab, D. J., Garcia-Garcia, J. C., Nikolskaia, O. V. & other authors (2009).** Protease activated receptor signaling is required for African trypanosome traversal of human brain microvascular endothelial cells. *PLoS Negl Trop Dis* **3**, e479.
- Grandgenett, P. M., Otsu, K., Wilson, H. R., Wilson, M. E. & Donelson, J. E. (2007).** A Function for a Specific Zinc Metalloprotease of African Trypanosomes. *PLoS Pathog* **3**, e150.
- Grassi-Zucconi, G., Semprevivo, M., Mocaer, E., Kristensson, K. & Bentivoglio, M. (1996).** Melatonin and its new agonist S-20098 restore synchronized sleep fragmented by experimental trypanosome infection in the rat. *Brain Res Bull* **39**, 63-68.
- Griffith, F. (1928).** The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)* **27**, 113-159.
- Grüntzig, J. W. & Mehlhorn, H. (2009).** *Expeditionen ins Reich der Seuchen - Medizinische Himmelfahrtskommandos der deutschen Kaiser- und Kolonialzeit*. Heidelberg: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag.

**Guadagno, E. & Moukhles, H. (2004).** Laminin-induced aggregation of the inwardly rectifying potassium channel, Kir4.1, and the water-permeable channel, AQP4, via a dystroglycan-containing complex in astrocytes. *Glia* **47**, 138-149.

**Guiral, S., Mitchell, T. J., Martin, B. & Claverys, J. P. (2005).** Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8710-8715.

**Hahn, H., Falke, D., Kaufmann, S. H. E. & Ullmann, U. (2004).** *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 5. Auflage edn. Berlin: Springer Verlag.

**Hammerschmidt, S., Tillig, M. P., Wolff, S., Vaerman, J. P. & Chhatwal, G. S. (2000).** Species-specific binding of human secretory component to SpsA protein of *Streptococcus pneumoniae* via a hexapeptide motif. *Mol Microbiol* **36**, 726-736.

**Hammerschmidt, S., Wolff, S., Hocke, A., Rosseau, S., Muller, E. & Rohde, M. (2005).** Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infect Immun* **73**, 4653-4667.

**Hammerschmidt, S. (2006).** Adherence molecules of pathogenic pneumococci. *Curr Opin Microbiol* **9**, 12-20.

**He, P. (2010).** Leucocyte/endothelium interactions and microvessel permeability: coupled or uncoupled? *Cardiovasc Res* **87**, 281-290.

**Henriques-Normark, B., Blomberg, C., Dagerhamn, J., Battig, P. & Normark, S. (2008).** The rise and fall of bacterial clones: *Streptococcus pneumoniae*. *Nature reviews Microbiology* **6**, 827-837.

**Hentschel, E. J. & Wagner, G. H. (1996).** *Zoologisches Wörterbuch*, 6. edn. Jena: Gustav Fischer Verlag.

**Herbert, W. J. & Lumsden, W. H. (1976).** *Trypanosoma brucei*: a rapid "matching" method for estimating the host's parasitemia. *Exp Parasitol* **40**, 427-431.

**Hicks, L. A., Harrison, L. H., Flannery, B. & other authors (2007).** Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998-2004. *J Infect Dis* **196**, 1346-1354.

**Hilleringmann, M., Giusti, F., Baudner, B. C., Masignani, V., Covacci, A., Rappuoli, R., Barocchi, M. A. & Ferlenghi, I. (2008).** Pneumococcal pili are composed of protofilaments exposing adhesive clusters of Rrg A. *PLoS Pathog* **4**, e1000026.

**Hirase, T., Staddon, J. M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Itoh, M., Furuse, M., Fujimoto, K., Tsukita, S. & Rubin, L. L. (1997).** Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci* **110 ( Pt 14)**, 1603-1613.

**Hirst, R. A., Kadioglu, A., O'Callaghan, C. & Andrew, P. W. (2004).** The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clin Exp Immunol* **138**, 195-201.

**Hirumi, H., Hirumi, K., Doyle, J. J. & Cross, G. A. (1980).** In vitro cloning of animal-infective bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* **80**, 371-382.

- Huang, S. H., Wass, C., Fu, Q., Prasadaraao, N. V., Stins, M. & Kim, K. S. (1995).** Escherichia coli invasion of brain microvascular endothelial cells in vitro and in vivo: molecular cloning and characterization of invasion gene ibe10. *Infect Immun* **63**, 4470-4475.
- Huber, J. D., Egleton, R. D. & Davis, T. P. (2001).** Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci* **24**, 719-725.
- Hülße, C., Littmann, M., Fiedler, K., Kaltofen, U. & Hundt, C. (1999).** Epidemiologische und serologische Untersuchungen von Pneumokokken-Infektionen im Hinblick auf die neuen STIKO-Empfehlungen. *Gesundheitswesen* **61**, 393-397.
- Hurst, R. D. & Fritz, I. B. (1996).** Properties of an immortalised vascular endothelial/glioma cell co-culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Physiol* **167**, 81-88.
- Hurst, R. D. (2000).** A useful in vitro blood-brain barrier model. *Neuroreport* **11**, L1-2.
- Huss, A., PhD, Scott, P., MSc, Stuck, A. E., MD, Trotter, C., PhD & Egger, M., MD MSc (2009).** Efficacy of pneumococcal vaccination in adults: a meta-analysis. *CMAJ* **180**, 48-58.
- Hyams, C., Camberlein, E., Cohen, J. M., Bax, K. & Brown, J. S. (2010).** The Streptococcus pneumoniae capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infect Immun* **78**, 704-715.
- IAEA (2004).** Seibersdorf Laboratories Entomology Unit - Tsetse fly (nagana). Wien.
- Inverso, J. A., Uphoff, T. S., Johnson, S. C., Paulnock, D. M. & Mansfield, J. M. (2010).** Biological Variation Among African Trypanosomes: I. Clonal Expression of Virulence Is Not Linked to the Variant Surface Glycoprotein or the Variant Surface Glycoprotein Gene Telomeric Expression Site. *DNA and Cell Biology* **29**, 215-227.
- Janzer, R. C. & Raff, M. C. (1987).** Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* **325**, 253-257.
- Jaseja, M., Mergen, L., Gillette, K., Forbes, K., Sehgal, I. & Copie, V. (2005).** Structure-function studies of the functional and binding epitope of the human 37 kDa laminin receptor precursor protein. *J Pept Res* **66**, 9-18.
- Jedrzejewski, M. J., Mello, L. V., de Groot, B. L. & Li, S. (2002).** Mechanism of hyaluronan degradation by Streptococcus pneumoniae hyaluronate lyase. Structures of complexes with the substrate. *J Biol Chem* **277**, 28287-28297.
- Jennings, F. W., Whitelaw, D. D., Holmes, P. H., Chizyuka, H. G. & Urquhart, G. M. (1979).** The brain as a source of relapsing Trypanosoma brucei infection in mice after chemotherapy. *Int J Parasitol* **9**, 381-384.
- Jong, A. Y., Stins, M. F., Huang, S. H., Chen, S. H. & Kim, K. S. (2001).** Traversal of Candida albicans across human blood-brain barrier in vitro. *Infect Immun* **69**, 4536-4544.
- Kadioglu, A., Taylor, S., Iannelli, F., Pozzi, G., Mitchell, T. J. & Andrew, P. W. (2002).** Upper and lower respiratory tract infection by Streptococcus pneumoniae is affected by pneumolysin deficiency and differences in capsule type. *Infect Immun* **70**, 2886-2890.

- Kadioglu, A., Weiser, J. N., Paton, J. C. & Andrew, P. W. (2008).** The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature reviews Microbiology* **6**, 288-301.
- Kagbadouno, M. S., Camara, M., Bouyer, J., Courtin, F., Onikoyamou, M. F., Schofield, C. J. & Solano, P. (2011).** Progress towards the eradication of Tsetse from the Loos islands, Guinea. *Parasit Vectors* **4**, 18.
- Kayser, F. H., Böttger, E. C. & Zinkernagel, R. M. (2005).** *Taschenbuch der Medizinischen Mikrobiologie*, 10. Auflage edn. Stuttgart: Thieme Verlag.
- Kennedy, P. G. (2008).** The continuing problem of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Ann Neurol* **64**, 116-126.
- Kim, J. A., Tran, N. D., Li, Z., Yang, F., Zhou, W. & Fisher, M. J. (2006).** Brain endothelial hemostasis regulation by pericytes. *J Cereb Blood Flow Metab* **26**, 209-217.
- Kim, J. O. & Weiser, J. N. (1998).** Association of intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **177**, 368-377.
- Kim, K. J., Elliott, S. J., Di Cello, F., Stins, M. F. & Kim, K. S. (2003).** The K1 capsule modulates trafficking of *E. coli*-containing vacuoles and enhances intracellular bacterial survival in human brain microvascular endothelial cells. *Cell Microbiol* **5**, 245-252.
- Kim, K. S. (2000).** *E. coli* invasion of brain microvascular endothelial cells as a pathogenetic basis of meningitis. *Subcell Biochem* **33**, 47-59.
- Kim, K. S. (2003).** Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nat Rev Neurosci* **4**, 376-385.
- Klinke, R., Pape, H.-C. & Silbernagl, S. (2003).** *Physiologie*. Stuttgart: Thieme Verlag.
- Koenig, J. M. & Keenan, W. J. (2009).** Group B streptococcus and early-onset sepsis in the era of maternal prophylaxis. *Pediatr Clin North Am* **56**, 689-708, Table of Contents.
- Korhonen, T. K., Valtonen, M. V., Parkkinen, J., Vaisanen-Rhen, V., Finne, J., Orskov, F., Orskov, I., Svenson, S. B. & Makela, P. H. (1985).** Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infect Immun* **48**, 486-491.
- Kristensson, K., Nygard, M., Bertini, G. & Bentivoglio, M. (2010).** African trypanosome infections of the nervous system: parasite entry and effects on sleep and synaptic functions. *Prog Neurobiol* **91**, 152-171.
- Kristjanson, P. M., Swallow, B.M., Rowlands, G.J., Kruska, R.L., de Leeuw, P.N., (1999).** Measuring the costs of African animal trypanosomosis, the potential benefits of control and returns to research. *Agric Syst* **59**, 79-98.
- Kroubi, M., Karembe, H. & Betbeder, D. (2011).** Drug delivery systems in the treatment of African trypanosomiasis infections. *Expert Opin Drug Deliv* **8**, 735-747.

- Kuchler-Bopp, S., Delaunoy, J. P., Artault, J. C., Zaepfel, M. & Dietrich, J. B. (1999).** Astrocytes induce several blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells. *Neuroreport* **10**, 1347-1353.
- Kuehne, S., Untucht, C., Steinert, M. & Wätzig, H. (2011).** Fast investigations from biological matrices using CE – test of a blood-brain barrier model. *Electrophoresis*, resubmitted after minor revisions.
- Kunze, P. (1938).** *Das Volksbuch unserer Kolonien: gemeinfreie Bilddatei* (Wikipedia).
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lancefield, R. C. (1933).** A Serological Differentiation of Human and Other Groups of Hemolytic Streptococci. *The Journal of experimental medicine* **57**, 571-595.
- Lang, S. & Palmer, M. (2003).** Characterization of Streptococcus agalactiae CAMP factor as a pore-forming toxin. *J Biol Chem* **278**, 38167-38173.
- Lang, W. & Löscher, T. (2000).** *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*, 3. edn. Stuttgart: Thieme Verlag.
- Legros, D., Ollivier, G., Gastellu-Etchegorry, M., Paquet, C., Burri, C., Jannin, J. & Buscher, P. (2002).** Treatment of human African trypanosomiasis--present situation and needs for research and development. *Lancet Infect Dis* **2**, 437-440.
- Lejon, V., Ngoyi, D. M., Boelaert, M. & Büscher, P. (2010).** A CATT Negative Result after Treatment for Human African Trypanosomiasis Is No Indication for Cure. *PLoS Negl Trop Dis* **4**, e590.
- Lemichez, E., Lecuit, M., Nassif, X. & Bourdoulous, S. (2010).** Breaking the wall: targeting of the endothelium by pathogenic bacteria. *Nat Rev Microbiol* **8**, 93-104.
- Lescure, F. X., Le Loup, G., Freilij, H., Develoux, M., Paris, L., Brutus, L. & Pialoux, G. (2010).** Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infect Dis* **10**, 556-570.
- Lippert, H. (2003).** *Lehrbuch Anatomie*. München: Urban & Fischer.
- Lofling, J., Vimberg, V., Battig, P. & Henriques-Normark, B. (2011).** Cellular interactions by LPxTG-anchored pneumococcal adhesins and their streptococcal homologues. *Cell Microbiol* **13**, 186-197.
- Lonsdale-Eccles, J. D. & Grab, D. J. (2002).** Trypanosome hydrolases and the blood-brain barrier. *Trends Parasitol* **18**, 17-19.
- Lopez, R., Demick, K. P., Mansfield, J. M. & Paulnock, D. M. (2008).** Type I IFNs play a role in early resistance, but subsequent susceptibility, to the African trypanosomes. *J Immunol* **181**, 4908-4917.
- Losos, G. J. & Ikede, B. O. (1972).** Review of pathology of disease in domestic and laboratory animals caused by Trypanosoma congolense, T. vivax, T. brucei, T. rhodesiense and T. gambiense. *Vet Pathol* **9**, 1-71.
- Madigan, M. T. & Martinko, J. M. (2009).** *Brock Mikrobiologie*. München: Pearson Education.
- Malley, R. (2010).** Antibody and cell-mediated immunity to Streptococcus pneumoniae: implications for vaccine development. *J Mol Med* **88**, 135-142.

- Mansfield, J. M. & Paulnock, D. M. (2005).** Regulation of innate and acquired immunity in African trypanosomiasis. *Parasite Immunol* **27**, 361-371.
- Marra, A. & Brigham, D. (2001).** Streptococcus pneumoniae causes experimental meningitis following intranasal and otitis media infections via a nonhematogenous route. *Infect Immun* **69**, 7318-7325.
- Marriott, H. M., Mitchell, T. J. & Dockrell, D. H. (2008).** Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction. *Curr Mol Med* **8**, 497-509.
- Masake, R. A., Nantulya, V. M., Akol, G. W. & Musoke, A. J. (1984).** Cerebral trypanosomiasis in cattle with mixed Trypanosoma congolense and T. brucei brucei infections. *Acta Trop* **41**, 237-246.
- Masocha, W., Robertson, B., Rottenberg, M. E., Mhlanga, J., Sorokin, L. & Kristensson, K. (2004).** Cerebral vessel laminins and IFN-gamma define Trypanosoma brucei brucei penetration of the blood-brain barrier. *J Clin Invest* **114**, 689-694.
- Masocha, W., Rottenberg, M. E. & Kristensson, K. (2006).** Minocycline impedes African trypanosome invasion of the brain in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 1798-1804.
- Masocha, W., Amin, D. N., Kristensson, K. & Rottenberg, M. E. (2008).** Differential invasion of Trypanosoma brucei brucei and lymphocytes into the brain of C57BL/6 and 129Sv/Ev mice. *Scand J Immunol* **68**, 484-491.
- McAllister, M. S., Krizanac-Bengez, L., Macchia, F. & other authors (2001).** Mechanisms of glucose transport at the blood-brain barrier: an in vitro study. *Brain Research* **904**, 20-30.
- McAuley, J. L., Hornung, F., Boyd, K. L., Smith, A. M., McKeon, R., Bennink, J., Yewdell, J. W. & McCullers, J. A. (2007).** Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell host & microbe* **2**, 240-249.
- McCool, T. L. & Weiser, J. N. (2004).** Limited role of antibody in clearance of Streptococcus pneumoniae in a murine model of colonization. *Infect Immun* **72**, 5807-5813.
- McIntosh, E. D. & Reinert, R. R. (2011).** Global prevailing and emerging pediatric pneumococcal serotypes. *Expert Rev Vaccines* **10**, 109-129.
- McLaughlin, J. (1986).** The association of distinct acid phosphatases with the flagella pocket and surface membrane fractions obtained from bloodstream forms of Trypanosoma rhodesiense. *Mol Cell Biochem* **70**, 177-184.
- Mehlhorn, H. (2004).** *Encyclopedic Reference of Parasitology*. Heidelberg: Springer Verlag.
- Meyrick, B. O., Ryan, U. S. & Brigham, K. L. (1986).** Direct effects of E coli endotoxin on structure and permeability of pulmonary endothelial monolayers and the endothelial layer of intimal explants. *Am J Pathol* **122**, 140-151.
- Minces, L. R., Brown, P. J. & Veldkamp, P. J. (2011).** Human meningitis from Streptococcus equi subsp. zooepidemicus acquired as zoonoses. *Epidemiol Infect* **139**, 406-410.
- Mitchell, T. J. (2003).** The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nature reviews Microbiology* **1**, 219-230.



**Morel, C. M. & Lazdins, J. (2003).** Chagas disease. *Nat Rev Microbiol* **1**, 14-15.

**Morty, R. E., Lonsdale-Eccles, J. D., Morehead, J., Caler, E. V., Mentele, R., Auerswald, E. A., Coetzer, T. H., Andrews, N. W. & Burleigh, B. A. (1999).** Oligopeptidase B from *Trypanosoma brucei*, a new member of an emerging subgroup of serine oligopeptidases. *J Biol Chem* **274**, 26149-26156.

**Mulenga, C., Mhlanga, J. D., Kristensson, K. & Robertson, B. (2001).** *Trypanosoma brucei brucei* crosses the blood-brain barrier while tight junction proteins are preserved in a rat chronic disease model. *Neuropathol Appl Neurobiol* **27**, 77-85.

**Murray, M., Morrison, W. I. & Whitelaw, D. D. (1982).** Host susceptibility to African trypanosomiasis: trypanotolerance. *Adv Parasitol* **21**, 1-68.

**Musher, D. M., Manof, S. B., Liss, C. & other authors (2010).** Safety and antibody response, including antibody persistence for 5 years, after primary vaccination or revaccination with pneumococcal polysaccharide vaccine in middle-aged and older adults. *J Infect Dis* **201**, 516-524.

**Naessens, J. (2006).** Bovine trypanotolerance: A natural ability to prevent severe anaemia and haemophagocytic syndrome? *Int J Parasitol* **36**, 521-528.

**Nag, S. (2003).** Morphology and molecular properties of cellular components of normal cerebral vessels. *Methods Mol Med* **89**, 3-36.

**Nag, S., Venugopalan, R. & Stewart, D. J. (2007).** Increased caveolin-1 expression precedes decreased expression of occludin and claudin-5 during blood-brain barrier breakdown. *Acta Neuropathol* **114**, 459-469.

**Nakagawa, S., Deli, M. A., Nakao, S., Honda, M., Hayashi, K., Nakaoke, R., Kataoka, Y. & Niwa, M. (2007).** Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol* **27**, 687-694.

**Nakagawa, S., Deli, M. A., Kawaguchi, H., Shimizudani, T., Shimono, T., Kittel, A., Tanaka, K. & Niwa, M. (2009).** A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int* **54**, 253-263.

**Nakazono, T., Murakami, T., Sakai, S., Higashi, Y. & Yata, N. (1992).** Application of microdialysis for study of caffeine distribution into brain and cerebrospinal fluid in rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **40**, 2510-2515.

**Nelson, A. L., Roche, A. M., Gould, J. M., Chim, K., Ratner, A. J. & Weiser, J. N. (2007).** Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect Immun* **75**, 83-90.

**Neufeld, F. (1902).** Über die Agglutination der Streptokokken und über die Theorien der Agglutination. *2 Hyg Infektkrankh* **40**, 54.

**Nikolskaia, O. V., de, A. L. A. P., Kim, Y. V., Lonsdale-Eccles, J. D., Fukuma, T., Scharfstein, J. & Grab, D. J. (2006a).** Blood-brain barrier traversal by African trypanosomes requires calcium signaling induced by parasite cysteine protease. *J Clin Invest* **116**, 2739-2747.

**Nikolskaia, O. V., Kim, Y. V., Kovbasnjuk, O., Kim, K. J. & Grab, D. J. (2006b).** Entry of *Trypanosoma brucei* gambiense into microvascular endothelial cells of the human blood-brain barrier. *Int J Parasitol* **36**, 513-519.

**Nikolskaia, O. V., de, A. L. A. P., Kim, Y. V., Lonsdale-Eccles, J. D., Fukuma, T., Scharfstein, J. & Grab, D. J. (2008).** Corrigendum: Blood-brain barrier traversal by African trypanosomes requires calcium signaling induced by parasite cysteine protease. *J Clin Invest* **118**, 1974.

**Nizet, V., Gibson, R. L., Chi, E. Y., Framson, P. E., Hulse, M. & Rubens, C. E. (1996).** Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. *Infect Immun* **64**, 3818-3826.

**Nooteboom, A., Hendriks, T., Otteholter, I. & van der Linden, C. J. (2000).** Permeability characteristics of human endothelial monolayers seeded on different extracellular matrix proteins. *Mediators Inflamm* **9**, 235-241.

**NRZ (2002).** Positionspapier "Impfung gegen Pneumokokken-Erkrankungen". In *Nationales Referenzzentrum für Streptokokken Aachen*.

**Nuorti, J. P., Butler, J. C., Farley, M. M., Harrison, L. H., McGeer, A., Kolczak, M. S. & Breiman, R. F. (2000).** Cigarette smoking and invasive pneumococcal disease. Active Bacterial Core Surveillance Team. *N Engl J Med* **342**, 681-689.

**Nuorti, J. P. & Whitney, C. G. (2010).** Prevention of pneumococcal disease among infants and children - use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine - recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* **59**, 1-18.

**O'Brien, K. L., Wolfson, L. J., Watt, J. P. & other authors (2009).** Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* **374**, 893-902.

**Oggioni, M. R., Memmi, G., Maggi, T., Chiavolini, D., Iannelli, F. & Pozzi, G. (2003).** Pneumococcal zinc metalloproteinase ZmpC cleaves human matrix metalloproteinase 9 and is a virulence factor in experimental pneumonia. *Mol Microbiol* **49**, 795-805.

**Ohnesorge, J. (2005).** Quantitative Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie – Untersuchung der Präzision mittels verschiedener Interner Standards. In *Dissertation im Fachbereich für Chemie und Pharmazie*. Braunschweig: Technische Universität Carolo-Wilhelmina.

**Okuyama, S. & Aihara, H. (1984).** The mode of action of analgesic drugs in adjuvant arthritic rats as an experimental model of chronic inflammatory pain: possible central analgesic action of acidic nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Jpn J Pharmacol* **35**, 95-103.

**Olesen, J., Hougaard, K. & Hertz, M. (1978).** Isoproterenol and Propranolol: Ability to Cross the Blood-Brain Barrier and Effects on Cerebral Circulation in Man. *Stroke* **9**, 344-349.

**Oli, M. W., Cotlin, L. F., Shiflett, A. M. & Hajduk, S. L. (2006).** Serum Resistance-Associated Protein Blocks Lysosomal Targeting of Trypanosome Lytic Factor in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell* **5**, 132-139.

**Orihuela, C. J., Mahdavi, J., Thornton, J. & other authors (2009).** Laminin receptor initiates bacterial contact with the blood brain barrier in experimental meningitis models. *The Journal of clinical investigation* **119**, 1638-1646.

**Owens, T., Bechmann, I. & Engelhardt, B. (2008).** Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation. *J Neuropathol Exp Neurol* **67**, 1113-1121.

**PAA (2011).** Quantum - Die Zelltyp-spezifischen Medien. In *PAA Laboratories GmbH*

**Papadopoulos, M. C., Saadoun, S., Davies, D. C. & Bell, B. A. (2001).** Emerging molecular mechanisms of brain tumour oedema. *Br J Neurosurg* **15**, 101-108.

**Pardridge, W. M. (2003).** Molecular biology of the blood-brain barrier. *Methods Mol Med* **89**, 385-399.

**Parker, E. R. & Sethi, A. (2011).** Chagas disease: coming to a place near you. *Dermatol Clin* **29**, 53-62.

**Parkinson, F. E., Friesen, J., Krizanac-Bengez, L. & Janigro, D. (2003).** Use of a three-dimensional in vitro model of the rat blood-brain barrier to assay nucleoside efflux from brain. *Brain Res* **980**, 233-241.

**Paterson, G. K. & Orihuela, C. J. (2010).** Pneumococcal microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules targeting of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* **77**, 1-5.

**Patterson, C. E., Rhoades, R. A. & Garcia, J. G. (1992).** Evans blue dye as a marker of albumin clearance in cultured endothelial monolayer and isolated lung. *J Appl Physiol* **72**, 865-873.

**Pays, E., Vanhollebeke, B., Vanhamme, L., Paturiaux-Hanocq, F., Nolan, D. P. & Perez-Morga, D. (2006).** The trypanolytic factor of human serum. *Nat Rev Microbiol* **4**, 477-486.

**Pearce, B. J., Iannelli, F. & Pozzi, G. (2002).** Construction of new unencapsulated (rough) strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Res Microbiol* **153**, 243-247.

**PEI (2011).** [http://www.pei.de/DE/arzneimittel/impfstoffe/pneumo/pneumo-node.html?\\_\\_nnn=true](http://www.pei.de/DE/arzneimittel/impfstoffe/pneumo/pneumo-node.html?__nnn=true) Impfstoffe gegen Pneumokokken. Edited by P. E. Institut. Langen.

**Pericone, C. D., Overweg, K., Hermans, P. W. & Weiser, J. N. (2000).** Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infect Immun* **68**, 3990-3997.

**Persidsky, Y., Ramirez, S. H., Haorah, J. & Kanmogne, G. D. (2006).** Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol* **1**, 223-236.

**Picozzi, K., Fevre, E. M., Odiit, M., Carrington, M., Eisler, M. C., Maudlin, I. & Welburn, S. C. (2005).** Sleeping sickness in Uganda: a thin line between two fatal diseases. *Bmj* **331**, 1238-1241.

**Platts, J. A., Abraham, M. H., Zhao, Y. H., Hersey, A., Ijaz, L. & Butina, D. (2001).** Correlation and prediction of a large blood-brain distribution data set--an LFER study. *Eur J Med Chem* **36**, 719-730.

**Pozzi, G., Masala, L., Iannelli, F., Manganelli, R., Havarstein, L. S., Piccoli, L., Simon, D. & Morrison, D. A. (1996).** Competence for genetic transformation in encapsulated strains of *Streptococcus pneumoniae*: two allelic variants of the peptide pheromone. *J Bacteriol* **178**, 6087-6090.

**Pracht, D., Elm, C., Gerber, J. & other authors (2005).** PavA of *Streptococcus pneumoniae* modulates adherence, invasion, and meningeal inflammation. *Infect Immun* **73**, 2680-2689.

**Priotto, G., Fogg, C., Balasegaram, M., Erphas, O., Louga, A., Checchi, F., Ghabri, S. & Piola, P. (2006).** Three drug combinations for late-stage *Trypanosoma brucei* gambiense sleeping sickness: a randomized clinical trial in Uganda. *PLoS Clin Trials* **1**, e39.

**Pulzova, L., Bhide, M. R. & Andrej, K. (2009).** Pathogen translocation across the blood-brain barrier. *FEMS Immunol Med Microbiol* **57**, 203-213.

**Raadt, P. d. & WHO (2005).** The history of sleeping sickness. Genf: World Health Organization.

**Radin, J. N., Orihuela, C. J., Murti, G., Guglielmo, C., Murray, P. J. & Tuomanen, E. I. (2005).** beta-Arrestin 1 participates in platelet-activating factor receptor-mediated endocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **73**, 7827-7835.

**Rajagopal, L. (2009).** Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. *Future Microbiol* **4**, 201-221.

**Rajasekhar, A. & Clancy, C. J. (2010).** Meningitis due to group C *Streptococcus*: a case report and review of the literature. *Scand J Infect Dis* **42**, 571-578.

**Ransohoff, R. M., Kivisakk, P. & Kidd, G. (2003).** Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* **3**, 569-581.

**Ransohoff, R. M. & Perry, V. H. (2009).** Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* **27**, 119-145.

**Rayner, C. F., Jackson, A. D., Rutman, A., Dewar, A., Mitchell, T. J., Andrew, P. W., Cole, P. J. & Wilson, R. (1995).** Interaction of pneumolysin-sufficient and -deficient isogenic variants of *Streptococcus pneumoniae* with human respiratory mucosa. *Infect Immun* **63**, 442-447.

**Reichel, A., Begley, D. J. & Abbott, N. J. (2003).** An overview of in vitro techniques for blood-brain barrier studies. *Methods Mol Med* **89**, 307-324.

**Richardson, J. P., Beecroft, R. P., Tolson, D. L., Liu, M. K. & Pearson, T. W. (1988).** Procyclin: an unusual immunodominant glycoprotein surface antigen from the procyclic stage of African trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol* **31**, 203-216.

**Ring, A., Weiser, J. N. & Tuomanen, E. I. (1998).** Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J Clin Invest* **102**, 347-360.

**RKI (2006).** Begründung der STIKO-Empfehlungen zur Impfung gegen Pneumokokken und Meningokokken vom Juli 2006. In *Epidemiologisches Bulletin*, pp. 255-270. Edited by R. K. Institut. Berlin.

**Roche (2003).** *Roche Lexikon Medizin*: Elsevier, München; Urban & Fischer.

**Rubins, J. B., Duane, P. G., Clawson, D., Charboneau, D., Young, J. & Niewoehner, D. E. (1993).** Toxicity of pneumolysin to pulmonary alveolar epithelial cells. *Infect Immun* **61**, 1352-1358.

**Ruckinger, S., van der Linden, M., Reinert, R. R., von Kries, R., Burckhardt, F. & Siedler, A. (2009a).** Reduction in the incidence of invasive pneumococcal disease after general vaccination with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in Germany. *Vaccine* **27**, 4136-4141.

**Ruckinger, S., von Kries, R., Siedler, A. & van der Linden, M. (2009b).** Association of serotype of *Streptococcus pneumoniae* with risk of severe and fatal outcome. *The Pediatric infectious disease journal* **28**, 118-122.

- Ruckinger, S., van der Linden, M., Reinert, R. R. & von Kries, R. (2010).** Efficacy of 7-valent pneumococcal conjugate vaccination in Germany: An analysis using the indirect cohort method. *Vaccine* **28**, 5012-5016.
- Salminen, T., Pulli, A. & Taskinen, J. (1997).** Relationship between immobilised artificial membrane chromatographic retention and the brain penetration of structurally diverse drugs. *J Pharm Biomed Anal* **15**, 469-477.
- Sambrook, J., Maniatis, T. & Fritsch (1989).** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schenk, P. & Konrad, K. (1980).** Ultrastructural localization of acid phosphatase in human laryngeal carcinoma. *Arch Otorhinolaryngol* **226**, 213-218.
- Schinkel, A. H. (1999).** P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* **36**, 179-194.
- Schubert-Unkmeir, A., Sokolova, O., Panzner, U., Eigenthaler, M. & Frosch, M. (2007).** Gene expression pattern in human brain endothelial cells in response to *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **75**, 899-914.
- Schwede, A. & Carrington, M. (2010).** Bloodstream form Trypanosome plasma membrane proteins: antigenic variation and invariant antigens. *Parasitology* **137**, 2029-2039.
- Scism, J. L., Laska, D. A., Horn, J. W., Gimple, J. L., Pratt, S. E., Shepard, R. L., Dantzig, A. H. & Wrighton, S. A. (1999).** Evaluation of an in vitro coculture model for the blood-brain barrier: comparison of human umbilical vein endothelial cells (ECV304) and rat glioma cells (C6) from two commercial sources. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **35**, 580-592.
- Scory, S., Caffrey, C. R., Stierhof, Y. D., Ruppel, A. & Steverding, D. (1999).** Trypanosoma brucei: killing of bloodstream forms in vitro and in vivo by the cysteine proteinase inhibitor Z-phe-ala-CHN2. *Exp Parasitol* **91**, 327-333.
- Shottmuller, H. (1903).** Die Artunterscheidung der fur den menschen Pathogen Streptokokken durch Blutagar. *Munch Med Wochenschr* **50**, 849-853.
- Sixt, M., Engelhardt, B., Pausch, F., Hallmann, R., Wendler, O. & Sorokin, L. M. (2001).** Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Cell Biol* **153**, 933-946.
- Smith, M. A. & Hilgenberg, L. G. (2002).** Agrin in the CNS: a protein in search of a function? *Neuroreport* **13**, 1485-1495.
- Smith, M. W. & Gumbleton, M. (2006).** Endocytosis at the blood-brain barrier: from basic understanding to drug delivery strategies. *J Drug Target* **14**, 191-214.
- Song, L., Ge, S. & Pachter, J. S. (2007).** Caveolin-1 regulates expression of junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells. *Blood* **109**, 1515-1523.
- Southern, E. (2006).** Southern blotting. *Nat Protoc* **1**, 518-525.

**Stanness, K. A., Westrum, L. E., Fornaciari, E., Mascagni, P., Nelson, J. A., Stenglein, S. G., Myers, T. & Janigro, D. (1997).** Morphological and functional characterization of an in vitro blood-brain barrier model. *Brain Res* **771**, 329-342.

**Stephens, J. W. W. & Fantham, H. B. (1910).** On the peculiar morphology of a trypanosome from a case of sleeping sickness and the possibility of its being a new species (*T. rhodesiense*). *Ann Trop Med Parasitol* **4**, 343-350.

**Steverding, D. (2008).** The history of African trypanosomiasis. *Parasit Vectors* **1**, 3.

**Stich, A. & Steverding, D. (2002).** Trypanosomen - Rückkehr einer Seuche. *Biologie in unserer Zeit* **32**, 294-301.

**Stins, M. F., Prasadaraao, N. V., Ibric, L., Wass, C. A., Luckett, P. & Kim, K. S. (1994).** Binding characteristics of *S. fimbriated* *Escherichia coli* to isolated brain microvascular endothelial cells. *Am J Pathol* **145**, 1228-1236.

**Stins, M. F., Gilles, F. & Kim, K. S. (1997).** Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells. *J Neuroimmunol* **76**, 81-90.

**Stins, M. F., Nemani, P. V., Wass, C. & Kim, K. S. (1999).** *Escherichia coli* binding to and invasion of brain microvascular endothelial cells derived from humans and rats of different ages. *Infect Immun* **67**, 5522-5525.

**Stins, M. F., Badger, J. & Sik Kim, K. (2001).** Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells. *Microb Pathog* **30**, 19-28.

**Stoppini, L., Buchs, P. A., Brun, R., Muller, D., Duport, S., Parisi, L. & Seebeck, T. (2000).** Infection of organotypic slice cultures from rat central nervous tissue with *Trypanosoma brucei brucei*. *Int J Med Microbiol* **290**, 105-113.

**Suda, K., Rothen-Rutishauser, B., Gunthert, M. & Wunderli-Allenspach, H. (2001).** Phenotypic characterization of human umbilical vein endothelial (ECV304) and urinary carcinoma (T24) cells: endothelial versus epithelial features. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **37**, 505-514.

**Takahashi, K., Sawasaki, Y., Hata, J., Mukai, K. & Goto, T. (1990).** Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* **26**, 265-274.

**Takahashi, K. & Sawasaki, Y. (1991).** Human endothelial cell line, ECV304, produces pro-urokinase. *In Vitro Cell Dev Biol* **27A**, 766-768.

**Takahashi, K. & Sawasaki, Y. (1992).** Rare spontaneously transformed human endothelial cell line provides useful research tool. *In Vitro Cell Dev Biol* **28A**, 380-382.

**Tan, K. H., Dobbie, M. S., Felix, R. A., Barrand, M. A. & Hurst, R. D. (2001).** A comparison of the induction of immortalized endothelial cell impermeability by astrocytes. *Neuroreport* **12**, 1329-1334.

**Tebruegge, M. & Curtis, N. (2008).** Epidemiology, etiology, pathogenesis, and diagnosis of recurrent bacterial meningitis. *Clinical microbiology reviews* **21**, 519-537.

**Tenenbaum, T., Spellerberg, B., Adam, R., Vogel, M., Kim, K. S. & Schroten, H. (2007).** *Streptococcus agalactiae* invasion of human brain microvascular endothelial cells is promoted by the laminin-binding protein Lmb. *Microbes Infect* **9**, 714-720.

**The-Wellcome-Trust, WHO/TDR & GeneDB (2005).** CD: Trypanosomatids: genomes and biology.

**Thuita, J. K., Kagira, J. M., Mwangangi, D., Matovu, E., Turner, C. M. & Masiga, D. (2008).** Trypanosoma brucei rhodesiense transmitted by a single tsetse fly bite in vervet monkeys as a model of human African trypanosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis* **2**, e238.

**Tomasz, A. & Hotchkiss, R. D. (1964).** Regulation of the Transformability of Pneumococcal Cultures by Macromolecular Cell Products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**, 480-487.

**Troeberg, L., Morty, R. E., Pike, R. N., Lonsdale-Eccles, J. D., Palmer, J. T., McKerrow, J. H. & Coetzer, T. H. (1999).** Cysteine proteinase inhibitors kill cultured bloodstream forms of Trypanosoma brucei brucei. *Exp Parasitol* **91**, 349-355.

**Untucht, C. (2007).** Diplomarbeit - Entwicklung eines Modells der Blut-Hirnschranke zur Untersuchung der Interaktion mit Trypanosomen. Würzburg: Julius-Maximilians-Universität.

**Untucht, C., Rasch, J., Fuchs, E., Rohde, M., Bergmann, S. & Steinert, M. (2011).** An optimized in vitro blood-brain barrier model reveals bidirectional transmigration of African trypanosome strains *Microbiology* **accepted for publication**.

**Uphoff, C. C. & Drexler, H. G. (2005a).** Detection of mycoplasma contaminations. *Methods Mol Biol* **290**, 13-23.

**Uphoff, C. C. & Drexler, H. G. (2005b).** Eradication of mycoplasma contaminations. *Methods Mol Biol* **290**, 25-34.

**Van Belle, K., Sarre, S., Ebinger, G. & Michotte, Y. (1995).** Brain, liver and blood distribution kinetics of carbamazepine and its metabolic interaction with clomipramine in rats: a quantitative microdialysis study. *J Pharmacol Exp Ther* **272**, 1217-1222.

**van der Poll, T. & Opal, S. M. (2009).** Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* **374**, 1543-1556.

**van Ginkel, F. W., McGhee, J. R., Watt, J. M., Campos-Torres, A., Parish, L. A. & Briles, D. E. (2003).** Pneumococcal carriage results in ganglioside-mediated olfactory tissue infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14363-14367.

**Van Reet, N., Pyana, P. P., Deborggraeve, S., Buscher, P. & Claes, F. (2011).** Trypanosoma brucei gambiense: HMI-9 medium containing methylcellulose and human serum supports the continuous axenic in vitro propagation of the bloodstream form. *Exp Parasitol* **128**, 285-290.

**Vanhamme, L., Paturiaux-Hanocq, F., Poelvoorde, P. & other authors (2003).** Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. *Nature* **422**, 83-87.

**Vanhollebeke, B., Truc, P., Poelvoorde, P., Pays, A., Joshi, P. P., Katti, R., Jannin, J. G. & Pays, E. (2006).** Human Trypanosoma evansi infection linked to a lack of apolipoprotein L-I. *N Engl J Med* **355**, 2752-2756.

**Vanhollebeke, B., Lecordier, L., Perez-Morga, D., Amiguet-Vercher, A. & Pays, E. (2007).** Human Serum Lyses Trypanosoma brucei by Triggering Uncontrolled Swelling of the Parasite Lysosome. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **54**, 448-451.

**Vanhollebeke, B., De Muylder, G., Nielsen, M. J., Pays, A., Tebabi, P., Dieu, M., Raes, M., Moestrup, S. K. & Pays, E. (2008).** A haptoglobin-hemoglobin receptor conveys innate immunity to *Trypanosoma brucei* in humans. *Science* **320**, 677-681.

**Vanhollebeke, B. & Pays, E. (2010).** The trypanolytic factor of human serum: many ways to enter the parasite, a single way to kill. *Mol Microbiol* **76**, 806-814.

**Vassella, E., Acosta-Serrano, A., Studer, E., Lee, S. H., Englund, P. T. & Roditi, I. (2001).** Multiple procyclin isoforms are expressed differentially during the development of insect forms of *Trypanosoma brucei*. *J Mol Biol* **312**, 597-607.

**Verani, J. R., McGee, L. & Schrag, S. J. (2010).** Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. *Centers for Disease Control and Prevention: Morbidity and Mortality Weekly Report* **59**, 1-32.

**Villa, A., Gutierrez, C., Gracia, E., Moreno, B., Chacón, G., Sanz, P. V., Büscher, P. & Touratier, L. (2008).** Presence of *Trypanosoma theileri* in Spanish Cattle. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1149**, 352-354.

**Vincendeau, P. & Bouteille, B. (2006).** Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. *An Acad Bras Cienc* **78**, 645-665.

**Virgintino, D., Robertson, D., Errede, M., Benagiano, V., Tauer, U., Roncali, L. & Bertossi, M. (2002).** Expression of caveolin-1 in human brain microvessels. *Neuroscience* **115**, 145-152.

**Watson, D. A., Kapur, V., Musher, D. M., Jacobson, J. W. & Musser, J. M. (1995).** Identification, cloning, and sequencing of DNA essential for encapsulation of *Streptococcus pneumoniae*. *Curr Microbiol* **31**, 251-259.

**Weiser, J. N., Austrian, R., Sreenivasan, P. K. & Masure, H. R. (1994).** Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infect Immun* **62**, 2582-2589.

**Weiser, J. N. (1998).** Phase variation in colony opacity by *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* **4**, 129-135.

**Weiser, J. N. (2010).** The pneumococcus: why a commensal misbehaves. *J Mol Med (Berl)* **88**, 97-102.

**Wellmer, A., Zysk, G., Gerber, J., Kunst, T., Von Mering, M., Bunkowski, S., Eiffert, H. & Nau, R. (2002).** Decreased virulence of a pneumolysin-deficient strain of *Streptococcus pneumoniae* in murine meningitis. *Infect Immun* **70**, 6504-6508.

**Wheeler, R. J. (2010).** The trypanolytic factor-mechanism, impacts and applications. *Trends Parasitol* **26**, 457-464.

**WHO (2007).** Global Burden of Hib and Pneumococcal Disease study.

**WHO (2009a).** <http://www.who.int/nuvi/pneumococcus/en/index.html> NUVI - *Streptococcus pneumoniae* (Pneumococcus).

**WHO (2009b).** Global health risks. Mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Genf: WHO.

**WHO (2010).** Fact sheet N°259 - African Trypanosomiasis.



**WHO & TDR (2011a).** <http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/african-trypanosomiasis> African Trypanosomiasis.

**WHO & TDR (2011b).** <http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/chagas> Chagas Disease.

**WHO/TDR** [www.who.int/tdr](http://www.who.int/tdr) TDR Image Library.

**Winterbottom, T. M. (1803).** An Account of the Native Afrikans in the Neighborhood of Sierra Leone (Vol 2). Hatchard & Mawman.

**Wolburg, H. (1995).** Orthogonal arrays of intramembranous particles: a review with special reference to astrocytes. *J Hirnforsch* **36**, 239-258.

**Wolburg, H. & Lippoldt, A. (2002).** Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol* **38**, 323-337.

**Wolburg, H., Noell, S., Mack, A., Wolburg-Buchholz, K. & Fallier-Becker, P. (2009).** Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res* **335**, 75-96.

**Xong, H. V., Vanhamme, L., Chamekh, M. & other authors (1998).** A VSG expression site-associated gene confers resistance to human serum in *Trypanosoma rhodesiense*. *Cell* **95**, 839-846.

**Yata, N., Toyoda, T., Murakami, T., Nishiura, A. & Higashi, Y. (1990).** Phosphatidylserine as a determinant for the tissue distribution of weakly basic drugs in rats. *Pharm Res* **7**, 1019-1025.

**Young, R. C., Mitchell, R. C., Brown, T. H. & other authors (1988).** Development of a new physicochemical model for brain penetration and its application to the design of centrally acting H2 receptor histamine antagonists. *J Med Chem* **31**, 656-671.

**Yu, A. S., McCarthy, K. M., Francis, S. A., McCormack, J. M., Lai, J., Rogers, R. A., Lynch, R. D. & Schneeberger, E. E. (2005).** Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**, C1231-1241.

**Yu, V. L., Chiou, C. C., Feldman, C. & other authors (2003).** An international prospective study of pneumococcal bacteremia: correlation with in vitro resistance, antibiotics administered, and clinical outcome. *Clin Infect Dis* **37**, 230-237.

**Zipfel, P. F. & Skerka, C. (2009).** Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol* **9**, 729-740.

**Zysk, G., Schneider-Wald, B. K., Hwang, J. H., Bejo, L., Kim, K. S., Mitchell, T. J., Hakenbeck, R. & Heinz, H. P. (2001).** Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **69**, 845-852.